

# Proteção interfacial de sistemas alimentares enriquecidos com ómega-3

Inês Filipa Mourão Ferreira

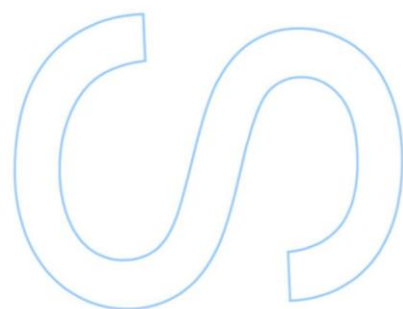
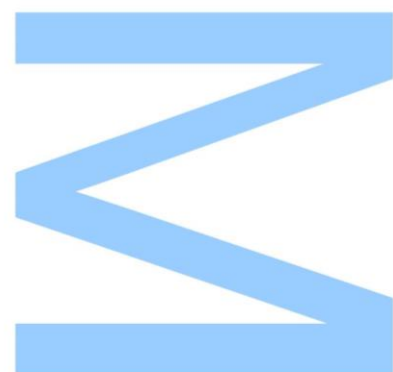
Mestrado em Química  
Departamento de Química e Bioquímica  
2015/2016

## **Orientador**

Maria de Fátima Azevedo Brandão Amaral Paiva Martins, Professora Auxiliar no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

## **Co-orientador**

Carlos Bravo-Díaz, Departamento de Química Física da Faculdade de Química da Universidade de Vigo





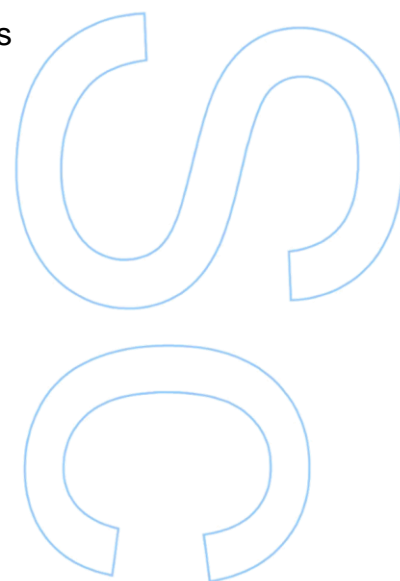
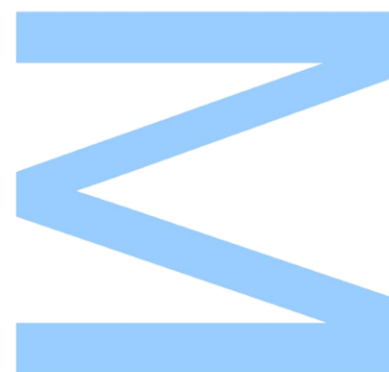
# **Proteção interfacial de sistemas alimentares enriquecidos com ómega-3**

Mestrado em Química  
Dissertação

Orientador na Universidade do Porto: Fátima Martins  
Orientador na Universidade de Vigo: Carlos Díaz

Inês Filipa Mourão Ferreira (201106585)

*Porto, setembro de 2016*



# **Proteção interfacial de sistemas alimentares enriquecidos com ómega-3**

Declaro que o presente trabalho foi, na íntegra, por mim realizado e que todo o material bibliográfico consultado se encontra devidamente referenciado.

Aluna:

(Inês Filipa Mourão Ferreira)

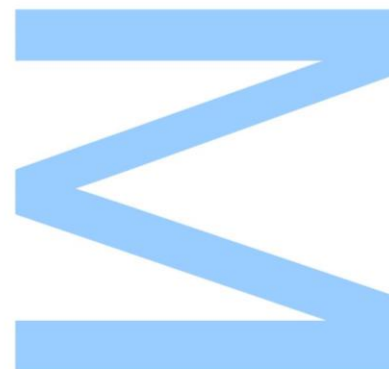
Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto como parte integrante dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Química, sob a orientação da Professora Doutora Maria de Fátima Azevedo Brandão Amaral Paiva Martins





Todas as correções determinadas  
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.  
O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_





# ***Agradecimentos***

O final desta dissertação não teria sido possível sem o apoio incondicional de pessoas que comigo partilharam esta experiência. Desta forma, gostaria de registar os meus mais sinceros agradecimentos:

À Professora Doutora Fátima Paiva Martins, orientadora deste projeto, pelo apoio, pelos ensinamentos, pela paciência e disponibilidade demonstrada ao longo desta etapa. O meu sincero e eterno obrigada!

Ao Professor Doutor Carlos Bravo Díaz, co-orientador, agradeço pela oportunidade da realização de parte deste trabalho na Universidade de Vigo. Agradeço, também, toda a disponibilidade e apoio demonstrado durante a minha estadia na cidade de Vigo. Agradeço, ainda, a partilha de ensinamentos e conhecimento científico bem como a amizade demonstrada.

À Marlene Costa, agradeço a partilha de experiências no laboratório e a ajuda incondicional para resolver situações inesperadas.

À Mafalda Meireles, agradeço todos os momentos partilhados em Vigo e no Porto, e a ajuda e apoio no trabalho experimental.

À Andreia Vaz, um grande obrigada por todo o apoio incondicional e pelos momentos de desabafo.

Ao Pedro, apesar de me ter começado a acompanhar apenas no final desta etapa, por todo o apoio, ajuda e paciência demonstrada.

Aos meus queridos pais, um enorme obrigada, por tornarem a realização desta etapa possível e por permitirem a concretização dos meus sonhos. Um enorme obrigada ainda pelo apoio incondicional ao longo deste projeto e por toda a paciência demonstrada. Por último, mas não por isso menos importante, à minha irmã e companheira diária por “aturar” todo o meu stress e impaciência quando o trabalho corria menos bem.





# Resumo

Ao longo dos anos tem surgido uma enorme necessidade de aumentar o tempo de prateleira de vários alimentos de modo a garantir uma maior segurança alimentar, em especial dos alimentos constituídos por sistemas emulsionados (maionese, margarinas, etc.). Esta necessidade tem levado à constante utilização de antioxidantes (AOs) na estabilização de emulsões alimentares. Existem diversos antioxidantes utilizados na indústria alimentar tendo muitos deles uma elevada solubilidade em água que os impede de desempenharem uma boa atividade antioxidante. Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de encontrar novos antioxidantes com idêntica atividade antiradicalar, mas com menor solubilidade na fase aquosa e maior solubilidade na região interfacial, local onde se prevê que ocorram as reações de oxidação lipídica. Neste trabalho estudou-se a distribuição do ácido gálico e dos seus derivados (todos os antioxidantes utilizados no estudo são comerciais) aplicando um método cinético que não requer o isolamento das várias fases da emulsão para estimar as constantes de partição,  $P_O^I$  e  $P_A^I$ , do ácido e dos seus ésteres, que descrevem a distribuição do antioxidante entre as regiões oleosa/interfacial ( $P_O^I$ ) e aquosa/interfacial ( $P_A^I$ ) em emulsões óleo de peixe/ Tween 80/ tampão citrato. Este método é baseado no modelo da pseudofase para emulsões termodinamicamente estáveis, o qual explora a reação entre os iões 4-hexadecilbenzenodiazônio, localizados exclusivamente na interface, e o antioxidante. Monitorizou-se a constante de velocidade ( $k_{obs}$ ) da reação através de um modelo de derivatização baseado na reação dos iões arenodiazóónio, que não reagem com o antioxidante, com um agente copulante adequado (dicloridrato de N-(Naft-1-il) etilenodiamina), produzindo um corante azóico estável. Obteve-se assim uma boa estimativa das duas constantes de partição.

Verificou-se que para os ésteres do ácido gálico, o aumento da hidrofobicidade da cadeia alquílica faz aumentar os valores das constantes  $P_A^O$ , em sistemas binários óleo de peixe/ tampão citrato. A constante de partição  $P_A^I$  apresentou um aumento à medida que aumentou a hidrofobicidade do derivado e por outro lado, a constante de partição  $P_O^I$  diminui com o aumento da hidrofobicidade dos compostos estudados. Relativamente à distribuição dos antioxidantes nas regiões da emulsão, verificou-se que o ácido gálico (GA) e o galato de metilo (MG), se distribuem apenas entre a região aquosa e interfacial; os AOs de cadeia intermédia, o galato de propilo (PG) e o galato

de butilo (BG) distribuem-se entre as três regiões da emulsão; o galato de octilo (OG), um dos antioxidantes estudados de cadeia longa, é aquele que apresenta uma maior percentagem na interface. O galato de octilo (OG) e o galato de dodecilo (LG) distribuem-se apenas na região interfacial e oleosa.

A avaliação da atividade antiradicalar realizou-se através do teste de DPPH• tendo-se verificado que, em solução metanólica, não existem diferenças significativas na atividade antiradicalar dos derivados do ácido gálico frente ao radical DPPH, resultado da estrutura fenólica comum a todos eles.

A aplicação do teste de Schaal permitiu verificar uma atividade antioxidante superior para o galato de octilo (OG) embora não tenha sido estatisticamente diferente da atividade do BG e LG.

Este resultado está de acordo com o estudo da distribuição verificando-se que a atividade antioxidante se correlaciona positivamente com a percentagem de AO que se encontra na interface. Assim, os compostos BG, OG e LG, todos com uma percentagem na interface bastante semelhante, apresentaram atividade antioxidante similar.

O aumento da fração de emulsionante provocou um aumento na percentagem de todos os compostos na interface para valores semelhantes. No entanto a estabilização das emulsões diminuiu com o aumento da fração de emulsionante uma vez que ocorreu simultaneamente uma diluição do AO na interface que não foi suficiente para contrabalançar o acréscimo de AO nessa região. Verificou-se igualmente, que quando os AOs se encontram em percentagens semelhantes na interface, apresentam melhor atividade antioxidante aqueles que se distribuem entre a interface e a região oleosa. Assim tornou-se possível aumentar significativamente a estabilidade oxidativa de emulsões contendo óleo de peixe que se mostrou muito instável e de difícil proteção. O galato de octilo (OG) foi o antioxidante mais adequado para efetuar esta proteção e é já permitido por lei (E311) para utilização em alimentos. A concentração necessária para efetuar esta proteção foi um pouco elevada, 1,25 mM, mas ainda se encontra dentro dos limites utilizados em produtos dietéticos, onde este AO pode ser utilizado até cerca de 1,4 mM [1]. Para obter a máxima eficácia antioxidante por parte do OG, deverá ser utilizada a quantidade mínima possível de emulsionante necessária para estabilizar a emulsão fisicamente.

Palavras-chave: antioxidantes; ácido gálico; emulsionante; método cinético; constantes de partição; distribuição; DPPH•; atividade antioxidante; Teste de estufa de Schaal; eficácia antioxidante.

# Abstract

Over the years it has emerged a huge need to increase the shelf life of various foods in order to ensure greater food security, especially food made of emulsion systems (mayonnaise, margarines, etc.). This need has led to the constant use of antioxidants (AOs) in stabilizing food emulsions. There are many antioxidants used in food industry. Many of them have a high water solubility which prevents them from playing a good antioxidant activity. Several studies have been conducted with the goal of finding new antioxidants with antiradical activity identical but with lower solubility in the aqueous phase and greater solubility in the interphase region, where is expected to occur the lipid oxidation reactions.

In this work, it was studied the distribution of Gallic Acid (GA) and its derivatives (all the antioxidants used in the study are commercial). It was applying a kinetic method that does not require the isolation of regions for estimating partition constants,  $P_O^I$  e  $P_A^I$ , that describe the distribution of the antioxidant regions between the oil/interphase ( $P_O^I$ ) and aqueous / interphase ( $P_A^I$ ) in fish oil / Tween 80 / citrate buffer of GA and its esters. This method is based on the model of pseudophase for thermodynamically stable emulsions, which exploits the reaction between 4-hexadecilbenzenodiazonio ions exclusively located in the interphase and the antioxidant. The rate constant ( $k_{obs}$ ) of the reaction was monitored by a derivatizing model based on reaction of the arenediazonium ions which do not react with the antioxidant with a suitable copulate agent (N-(Naphth-1-yl) ethylenediamine dihydrochloride) producing a stable azo dye. This yields a good estimate of the two partition constants.

It was found that for GA esters and increasing hydrophobicity of the alkyl chain, the values of binary constants for fish oil / citrate buffer system increased, in binary systems fish oil/ citrate buffer. The partition constant  $P_A^I$  shows an increase with the increase of the hydrophobicity of the derivative and on the other hand, the partition constant  $P_O^I$  decreases with increasing hydrophobicity of the studied compounds. in the emulsion regions, GA and methyl gallate (MG) are distributed only between the aqueous and interphase region. The mid-chain AOs, propyl gallate (PG) and butyl gallate (BG), are distributed between the three regions of the emulsion; octyl gallate (OG), and dodecyl gallate (LG) are distributed in the interphase region and oily region.

The evaluation of antiradical activity was carried out by applying the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) test and was examined in methanol solution. There are no significant differences in antiradical activity of GA derivatives from the DPPH radical, the result of common phenolic structure to all of them.

The application of the Schaal test has shown that the antioxidant activity is higher for OG although it was not statistically different from the activity of BG and LG.

This result is in agreement with the study of the distribution verifying that the antioxidant activity is positively correlated with the proportion of AO which is in interphase. So, compounds BG, OG and LG, all with a percentage very similar in interphase showed similar antioxidant activity. When increasing the emulsifier fraction the outcome is an increase in the percentage of all compounds in interphase for similar values. However, the emulsion stabilization decreases when fraction emulsifier increases since there is a dilution of AO and the percent of this in the interphase region was not sufficient to counteract the increase in this region. It was also found that when the AOs are at similar rates at the interface, those that are distributed between the interphase and the oil region have better antioxidant activity. So has become possible increase significantly the oxidative stability of emulsions containing fish oil that was proved to be very unstable and difficult to protect.

OG is the most suitable to carry out this antioxidant protection and its use in food is allowed by law (E311). The concentration required to realize this protection was a little high, 1.25 mM, but is still within the limits used in dietetic products, where this AO can be used up to about 1.4 mM [1]. For maximum effectiveness of OG it should be used a minimum amount of emulsifier to stabilize physically the emulsion.

Key words: antioxidants; gallic acid; emulsifier; kinetic method; partition constants; distribution; DPPH<sup>•</sup>; antioxidant activity; Schaal's Oven test; antioxidant efficiency.

# Índice

<b>Capítulo 1 – Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. OXIDAÇÃO LIPÍDICA .....	1
1.1.1. Fatores que influenciam a velocidade da oxidação lipídica em alimentos ....	5
1.2. ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES: ESTRATÉGIA PARA INIBIR A OXIDAÇÃO LIPÍDICA .....	6
1.2.1. Ácidos fenólicos.....	9
1.2.2. Ácido Gálico.....	10
1.3. OTIMIZAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIOXIDANTE EM EMULSÕES: IMPORTÂNCIA DA DISTRIBUIÇÃO DO ANTIOXIDANTE .....	12
1.4. DISTRIBUIÇÃO DE AOS EM EMULSÕES ALIMENTARES MODELO .....	14
1.4.1. Partição de antioxidantes em emulsões.....	14
1.4.2. Método cinético utilizado para determinar a distribuição de antioxidantes em emulsões – Fundamento teórico.....	16
1.4.2.1. Modelo cinético da pseudofase (MCP) estendido a emulsões .....	16
1.4.2.2. Simplificação do modelo cinético da pseudofase (MCPS) .....	21
1.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	25
1.5.1. Avaliação do nível de oxidação .....	26
1.5.1.1. Métodos baseados na determinação de produtos primários da oxidação .....	26
1.5.1.2. Métodos baseados na determinação de produtos secundários da oxidação.....	27
1.6. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIRADICALAR .....	27
<b>Capítulo 2 – Objetivo.....</b>	<b>29</b>
<b>Capítulo 3 – Métodos e Procedimentos Experimentais .....</b>	<b>31</b>
3.1. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA FASE OLEOSA UTILIZADA NA PREPARAÇÃO DAS EMULSÕES MODELO .....	31
3.2. ELIMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS PRESENTES NO ÓLEO DE PEIXE .....	31
3.3. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE PARTIÇÃO BINÁRIA, $P_A^O$ , DOS ANTIOXIDANTES NUMA MISTURA BINÁRIA ÓLEO DE PEIXE/ÁGUA .....	32
3.4. MÉTODO CINÉTICO PARA A DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE PARTIÇÃO EM EMULSÕES MODELO .....	34

3.4.1. Preparação de reagentes e soluções .....	34
3.4.1.1. Preparação da solução de dicloridrato de N-(Naft-1-il)etilenodiamina (NED.2HCl) .....	35
3.4.1.2. Preparação da solução tampão ácido cítrico-citrato .....	35
3.4.1.3. Síntese do sal de arenodiazônio e preparação de uma solução de $16\text{ArN}_2^+$ .....	35
3.4.2. Preparação de emulsões .....	36
3.4.3. Determinação das constantes de velocidade $k_{\text{obs}}$ das emulsões .....	36
3.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRADICALAR – MÉTODO DO DPPH .....	37
3.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EMULSÕES – TESTE DE ESTUFA DE SCHAAL .....	38
3.6.1. Determinação de dienos conjugados .....	39
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	39
<b>Capítulo 4 – Resultados e Discussão .....</b>	<b>41</b>
4.1. COMPOSIÇÃO DO ÓLEO DE PEIXE .....	41
4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRADICALAR .....	42
4.2.1. Método do DPPH' .....	42
4.3. DISTRIBUIÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO E DOS SEUS DERIVADOS EM SISTEMAS BINÁRIOS ÓLEO DE PEIXE/ÁGUA .....	44
4.3.1. Determinação da constante de partição $P_A^O$ .....	44
4.4. DISTRIBUIÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO E DOS SEUS DERIVADOS EM EMULSÕES ÓLEO DE PEIXE/ÁGUA .....	46
4.4.1. Distribuição do ácido gálico e do galato de metilo em emulsões óleo de peixe/tampão citrato (O/A) .....	46
4.4.1.1. Determinação do $k_{\text{obs}}$ mediante o método da derivatização e cálculo da constante de partição, $P_A^I$ .....	46
4.4.1.2. Análise da distribuição do ácido gálico e do galato de metilo .....	50
4.4.2. Distribuição do galato de propilo e do galato de butilo em emulsões óleo de peixe/tampão citrato (O/A) .....	51
4.4.2.1. Determinação do $k_{\text{obs}}$ mediante o método da derivatização e cálculo das constantes de partição, $P_A^I$ e $P_O^I$ .....	51
4.4.2.2. Análise da distribuição do galato de propilo e do galato de butilo .....	54
4.4.3. Distribuição do galato de octilo e do galato de dodecilo em emulsões óleo de peixe/tampão citrato (O/A) .....	56

4.4.3.1. Determinação do $k_{\text{obs}}$ mediante o método da derivatização e cálculo da constante de partição, $P_o^I$ .....	56
4.4.3.2. Análise da distribuição do galato de octilo e do galato de dodecilo.....	60
4.4.4. Análise comparativa da distribuição do ácido gálico e dos seus derivados	61
4.4.5. Avaliação da atividade antioxidante – Teste de estufa de Schaal .....	65
4.4.5.1. Avaliação do efeito da fração de emulsionante na atividade antioxidante .....	68
<b>Capítulo 5 – Conclusão.....</b>	<b>71</b>
<b>Capítulo 6 – Bibliografia .....</b>	<b>75</b>
<b>Anexos - Informação Suplementar .....</b>	<b>79</b>





# *Lista de Figuras*

<b>Figura 1.</b> Estrutura química das moléculas de EPA (A) e DHA (B).....	1
<b>Figura 2.</b> Estabilização do radical fenoxilo por deslocalização eletrónica. ....	8
<b>Figura 3.</b> Estrutura do catecol. ....	8
<b>Figura 4.</b> Estabilização do radical por ligações de hidrogénio intramoleculares. ....	8
<b>Figura 5.</b> Estrutura química dos derivados do ácido benzóico.....	9
<b>Figura 6.</b> Emulsão óleo em água (O/A) (A) e água em óleo (A/O) (B). ....	12
<b>Figura 7.</b> Ação do antioxidante em emulsões O/A (A) e emulsões A/O (B). ....	13
<b>Figura 8.</b> Esquema representativo de uma mistura binária O/A.....	14
<b>Figura 9.</b> Esquema representativo das duas pseudofases que constituem um sistema micelar e expressão que permite o cálculo da constante da distribuição do AO nas duas regiões.....	16
<b>Figura 10.</b> Esquema representativo das três regiões de uma emulsão que contém um AO cuja distribuição vem definida pelas constantes de partição. ....	17
<b>Figura 11.</b> Esquema representativo de uma emulsão: $\Phi$ indica a fração de volume para cada uma das regiões, AO é o antioxidante, P é a constante de partição, $k_i$ é a constante de velocidade para a reação dos iões de arenodiazónio na interface com o AO e os índices O, I e A representam a região oleosa, a interfacial e a aquosa, respetivamente. ....	18
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática da região interfacial de uma emulsão com base no modelo cinético da pseudofase que mostra a partição do antioxidante, AO, entre as regiões interfacial e oleosa. ....	22
<b>Figura 13.</b> Representação esquemática da região interfacial de uma emulsão com base no modelo cinético da pseudofase que mostra a partição do antioxidante, AO, entre as regiões interfacial e aquosa. ....	24
<b>Figura 14.</b> Espectro de absorção UV do ácido gálico.....	33
<b>Figura 15.</b> Espectro de absorção UV do óleo de peixe. ....	33
<b>Figura 16.</b> Esquema do procedimento experimental seguido para a determinação da constante de partição binária. ....	34
<b>Figura 17.</b> Reação da síntese do sal de arenodiazónio.....	35
<b>Figura 18.</b> Reação do agente copulante dicloridrato de N-(Naft-1-il)etilenodiamina (NED.2HCl) com os iões $16\text{-ArN}_2^+$ . ....	37

<b>Figura 19.</b> Cromatograma do óleo de peixe utilizado para os estudos da determinação da atividade antioxidante do ácido gálico e dos seus derivados.....	41
<b>Figura 20.</b> Variação da absorvância do radical DPPH• ( $\lambda=515$ nm) na presença de diferentes concentrações de galato de butilo -●- 0,051 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,068 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,085 mol de AO/mol DPPH•, .....	43
<b>Figura 21.</b> Representação da variação da percentagem de DPPH• com a concentração de galato de butilo, expressa em mol AO/mol DPPH•, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear.....	43
<b>Figura 22.</b> Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [A_t - A_\infty]$ vs tempo para o GA. Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), $\Phi = 0,005$ , $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,86 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 2,98 \times 10^{-3}$ M, $[NED] = 0,019$ M, $T = 25,7$ °C. ....	47
<b>Figura 23.</b> Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [A_t - A_\infty]$ vs tempo para o MG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), $\Phi = 0,005$ , $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,83 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 3,05 \times 10^{-3}$ M, $[NED] = 0,019$ M, $T = 25,7$ °C. ....	47
<b>Figura 24.</b> Representação de $k_{obs}$ e $1/k_{obs}$ vs fração de emulsionante ( $\Phi_I$ ) com os respectivos ajustes às Equações 49 e 50, para o GA. Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,86 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 2,98 \times 10^{-3}$ M, $[NED] = 0,019$ M, $T = 25,7$ °C. ....	48
<b>Figura 25.</b> Representação de $k_{obs}$ e $1/k_{obs}$ vs fração de emulsionante ( $\Phi_I$ ) com os respectivos ajustes às Equações 49 e 50, para o MG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,83 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 3,05 \times 10^{-3}$ M, $[NED] = 0,019$ M, $T = 25,7$ °C. ....	48
<b>Figura 26.</b> Variação da percentagem de GA e MG nas fases aquosa (AQ) e interfacial (IF) do sistema emulsionado.....	50
<b>Figura 27.</b> Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [A_t - A_\infty]$ vs tempo para o PG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), $\Phi = 0,015$ , $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,82 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 3,05 \times 10^{-3}$ M, $[NED] = 0,019$ M, $T = 25,8$ °C. ....	51
<b>Figura 28.</b> Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [A_t - A_\infty]$ vs tempo para o BG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), $\Phi = 0,015$ , $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,83 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 3,01 \times 10^{-3}$ M, $[NED] = 0,019$ M, $T = 25,3$ °C. ....	52
<b>Figura 29.</b> Representação de $k_{obs}$ e $1/k_{obs}$ vs fração de emulsionante ( $\Phi_I$ ) com os respectivos ajustes às Equações 30 e 31, para o PG. Condições experimentais: emulsão	

4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,82 \times 10^{-4} \text{ M}$ , $[\text{AO}] = 3,05 \times 10^{-3} \text{ M}$ , $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$ , $T = 25,8 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	52
<b>Figura 30.</b> Representação de $k_{\text{obs}}$ e $1/k_{\text{obs}}$ vs fração de emulsificante ( $\Phi_i$ ) com os respectivos ajustes às Equações 30 e 31, para o BG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,83 \times 10^{-4} \text{ M}$ , $[\text{AO}] = 3,05 \times 10^{-3} \text{ M}$ , $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$ , $T = 25,2 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	53
<b>Figura 31.</b> Variação da percentagem de galato de propilo e galato de butilo nas fases aquosa (AQ), interfacial (IF) e oleosa (O) do sistema emulsionado (A), apenas na região interfacial (B), na região oleosa (C) e na região aquosa (D).....	55
<b>Figura 32.</b> Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [A_t - A_\infty]$ vs tempo para o OG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), $\Phi = 0,015$ , $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,83 \times 10^{-4} \text{ M}$ , $[\text{AO}] = 3,05 \times 10^{-3} \text{ M}$ , $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$ , $T = 25,2 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	56
<b>Figura 33.</b> Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [A_t - A_\infty]$ vs tempo para o LG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), $\Phi = 0,015$ , $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,84 \times 10^{-4} \text{ M}$ , $[\text{AO}] = 3,07 \times 10^{-3} \text{ M}$ , $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$ , $T = 25,3 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	57
<b>Figura 34.</b> Representação de $k_{\text{obs}}$ e $1/k_{\text{obs}}$ vs fração de emulsificante ( $\Phi_i$ ) com os respectivos ajustes às Equações 40 e 44 para o OG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,83 \times 10^{-4} \text{ M}$ , $[\text{AO}] = 3,05 \times 10^{-3} \text{ M}$ , $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$ , $T = 25,2 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	58
<b>Figura 35.</b> Representação de $k_{\text{obs}}$ e $1/k_{\text{obs}}$ vs fração de emulsificante ( $\Phi_i$ ) com os respectivos ajustes às Equações 40 e 44 para o LG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,84 \times 10^{-4} \text{ M}$ , $[\text{AO}] = 3,07 \times 10^{-3} \text{ M}$ , $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$ , $T = 25,3 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	58
<b>Figura 36.</b> Variação da percentagem de OG e LG nas fases oleosa (O) e interfacial (IF) do sistema emulsionado. ....	60
<b>Figura 37.</b> Variação da percentagem do ácido gálico e dos seus derivados no sistema emulsionado (A) na interface (IF) (B), na fase oleosa (O) (C) e na fase aquosa (AQ) (D) do sistema emulsionado. ....	62
<b>Figura 38.</b> Variação da percentagem de dienos conjugados ao longo do tempo de armazenamento numa estufa termostaticada a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	65
<b>Figura 39.</b> Variação da percentagem de dienos conjugados ao longo do tempo de armazenamento numa estufa termostaticada a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , com emulsões contendo diferentes concentrações de antioxidante. ....	66
<b>Figura 40.</b> Tempo para que as emulsões contendo 1% de emulsificante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5%. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro	

representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: emulsões 4:6 (Óleo de peixe/tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 /Tween 80), [AO] = 1,25 mM, T = 40 °C..... 67

**Figura 41.** Tempo (Dias) para que as emulsões contendo 0,5%, 1% e 2% de emulsificante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5%. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes; letras coloridas – compostos diferentes, percentagem de Tween 80 igual; letras pretas – compostos iguais, percentagem de Tween 80 diferente). Condições experimentais: emulsões 4:6 (Óleo de peixe/tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 /Tween 80), [AO] = 1,25 mM, T = 40 °C..... 68

**Figura 42.** Correlação da distribuição e da eficácia antioxidante com a hidrofobicidade dos AOs para  $\Phi_I=0,005$ . ..... 70

**Figura 43.** Variação da absorvância do radical DPPH• ( $\lambda=515$  nm) na presença de diferentes concentrações de ácido gálico -●- 0,061 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,081 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,10 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,12 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,14 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,16 mol de AO/mol DPPH•, T=25°C. .... 80

**Figura 44.** Representação da variação da percentagem de DPPH• com a concentração de ácido gálico, expressa em mol AO/mol DPPH•, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear. .... 80

**Figura 45.** Variação da absorvância do radical DPPH• ( $\lambda=515$  nm) na presença de diferentes concentrações de galato de metilo -●- 0,055 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,073 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,091 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,11 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,13 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,15 mol de AO/mol DPPH•, T=25°C. .... 81

**Figura 46.** Representação da variação da percentagem de DPPH• com a concentração de galato de metilo, expressa em mol AO/mol DPPH•, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear..... 81

**Figura 47.** Variação da absorvância do radical DPPH• ( $\lambda=515$  nm) na presença de diferentes concentrações de galato de etilo -●- 0,046 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,062 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,077 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,093 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,11 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,12 mol de AO/mol DPPH•, T=25°C..... 81

**Figura 48.** Representação da variação da percentagem de DPPH• com a concentração de galato de etilo, expressa em mol AO/mol DPPH•, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear. .... 82

**Figura 49.** Variação da absorvância do radical DPPH• ( $\lambda=515$  nm) na presença de diferentes concentrações de galato de propilo -●- 0,051 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,065

mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>, -●- 0,084 mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>, -●- 0,10 mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>,  
-●- 0,12 mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>, -●- 0,13 mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>, T=25°C..... 82

**Figura 50.** Representação da variação da percentagem de DPPH<sup>•</sup> com a concentração de galato de propilo, expressa em mol AO/mol DPPH<sup>•</sup>, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear..... 82

**Figura 51.** Variação da absorvância do radical DPPH<sup>•</sup> ( $\lambda=515$  nm) na presença de diferentes concentrações de galato de octilo -●- 0,053 mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>, -●- 0,070 mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>, -●- 0,088 mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>, -●- 0,11 mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>, -●- 0,12 mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>, -●- 0,14 mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>, T=25°C..... 83

**Figura 52.** Representação da variação da percentagem de DPPH<sup>•</sup> com a concentração de galato de octilo, expressa em mol AO/mol DPPH<sup>•</sup>, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear..... 83

**Figura 53.** Variação da absorvância do radical DPPH<sup>•</sup> ( $\lambda=515$  nm) na presença de diferentes concentrações de galato de dodecilo -●- 0,046 mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>, -●- 0,062 mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>, -●- 0,077 mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>, -●- 0,093 mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>, -●- 0,11 mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>, -●- 0,12 mol de AO/mol DPPH<sup>•</sup>, T=25°C..... 83

**Figura 54.** Representação da variação da percentagem de DPPH<sup>•</sup> com a concentração de galato de dodecilo, expressa em mol AO/mol DPPH<sup>•</sup>, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear..... 84

**Figura 55.** Reta de calibração do ácido gálico (GA) em solução metanólica a um comprimento de onda de 269 nm e respetiva equação da reta. .... 85

**Figura 56.** Reta de calibração do galato de metilo (MG) em solução metanólica a um comprimento de onda de 269 nm e respetiva equação da reta. .... 87

**Figura 57.** Reta de calibração do galato de propilo (PG) em solução metanólica a um comprimento de onda de 269 nm e respetiva equação da reta. .... 88

**Figura 58.** Reta de calibração do galato de butilo (BG) em solução metanólica a um comprimento de onda de 269 nm e respetiva equação da reta. .... 89

**Figura 59.** Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln [A_t - A_\infty]$  vs tempo para o GA para as diversas frações de Tween 80 ( $\Phi = 0,005$  (A),  $\Phi = 0,008$  (B),  $\Phi = 0,015$  (C),  $\Phi = 0,022$  (D),  $\Phi = 0,031$  (E),  $\Phi = 0,042$  (F)). Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65/ Tween 80),  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,86 \times 10^{-4}$  M,  $[AO] = 3 \times 10^{-3}$  M,  $[NED] = 0,019$  M, T = 25 °C. .... 91

**Figura 60.** Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln [A_t - A_\infty]$  vs tempo para o MG para as diversas frações de Tween 80 ( $\Phi = 0,005$  (A),  $\Phi = 0,008$  (B),  $\Phi = 0,022$  (C),  $\Phi = 0,031$  (D),  $\Phi = 0,042$  (E). Condições

experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65/ Tween 80),  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,86 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[\text{AO}] = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$ ,  $T = 25^\circ \text{C}$ . ..... 92

**Figura 61.** Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln [A_t - A_\infty]$  vs tempo para o PG para as diversas frações de Tween 80 ( $\Phi = 0,005$  (A),  $\Phi = 0,008$  (B),  $\Phi = 0,015$  (C),  $\Phi = 0,022$  (D),  $\Phi = 0,042$  (E). Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65/ Tween 80),  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,86 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[\text{AO}] = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$ ,  $T = 25^\circ \text{C}$ . ..... 93

**Figura 62.** Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln [A_t - A_\infty]$  vs tempo para o BG para as diversas frações de Tween 80 ( $\Phi = 0,005$  (A),  $\Phi = 0,008$  (B),  $\Phi = 0,015$  (C),  $\Phi = 0,031$  (D),  $\Phi = 0,042$  (E). Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65/ Tween 80),  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,86 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[\text{AO}] = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$ ,  $T = 25^\circ \text{C}$ . ..... 94

**Figura 63.** Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln [A_t - A_\infty]$  vs tempo para o OG para as diversas frações de Tween 80 ( $\Phi = 0,005$  (A),  $\Phi = 0,008$  (B),  $\Phi = 0,015$  (C),  $\Phi = 0,022$  (D),  $\Phi = 0,031$  (E) e  $\Phi = 0,042$  (F). Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65/ Tween 80),  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,86 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[\text{AO}] = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$ ,  $T = 25^\circ \text{C}$ . ..... 95

**Figura 64.** Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln [A_t - A_\infty]$  vs tempo para o LG para as diversas frações de Tween 80 ( $\Phi = 0,005$  (A),  $\Phi = 0,008$  (B),  $\Phi = 0,015$  (C),  $\Phi = 0,022$  (D),  $\Phi = 0,031$  (E) e  $\Phi = 0,042$  (F). Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65/ Tween 80),  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,86 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[\text{AO}] = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$ ,  $T = 25^\circ \text{C}$ . ..... 96

**Figura 65.** Variação da percentagem de dienos conjugados ao longo do tempo de armazenamento numa estufa termostaticada a  $40^\circ \text{C}$ , com emulsões contendo 1% de Tween 80 e 1,25 mM de antioxidante. ..... 96

**Figura 66.** Variação da percentagem de dienos conjugados ao longo do tempo de armazenamento numa estufa termostaticada a  $40^\circ \text{C}$ , com emulsões contendo 0,5% de Tween 80 e 1,25 mM de antioxidante. ..... 97

**Figura 67.** Variação da percentagem de dienos conjugados ao longo do tempo de armazenamento numa estufa termostaticada a  $40^\circ \text{C}$ , com emulsões contendo 1% de Tween 80 e 1,25 mM de antioxidante. ..... 98

**Figura 68.** Variação da percentagem de dienos conjugados ao longo do tempo de armazenamento numa estufa termostaticada a  $40^\circ \text{C}$ , com emulsões contendo 2% de Tween 80 e 1,25 mM de antioxidante. ..... 98

# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Estrutura química do ácido gálico e dos seus derivados fazendo referência aos galatos autorizados como antioxidantes [13, 21]. .....	11
<b>Tabela 2.</b> Valores dos tempos de retenção (min) e a quantidade (%) dos ácidos gordos que constituem o óleo de peixe utilizado para os vários estudos. ....	42
<b>Tabela 3.</b> Valores de $EC_{50}$ obtidos para diferentes tempos de reação para o ácido gálico e seus derivados.....	44
<b>Tabela 4.</b> Percentagem dos diferentes antioxidantes na fase aquosa e oleosa de uma mistura binária óleo de peixe/água e os valores das constantes de partição. ....	45
<b>Tabela 5.</b> Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados das Figuras 24 e 25 à Equação 50.....	49
<b>Tabela 6.</b> Valores de $P_A^I$ e $k_I$ obtidos para a emulsão 4:6 (O/A) a partir do ajuste dos dados das Figura 24 e 25 à Equação 50.....	49
<b>Tabela 7.</b> Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados das Figuras 29 e 30 à Equação 31.....	53
<b>Tabela 8.</b> Valores de $P_A^I$ , $P_O^I$ , $P_A^O$ e $k_I$ , obtidos a partir da determinação espectrofotométrica de $P_A^O$ e de vários ensaios ( $k_{obs}$ , $\Phi_I$ ) para emulsões 4:6 (óleo/água), T=25 °C. ....	54
<b>Tabela 9.</b> Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados das Figuras 34 e 35 à Equação 44.....	58
<b>Tabela 10.</b> Valores de $P_O^I$ e $k_I$ obtidos a partir do ajuste dos dados à Equação 44. ...	59
<b>Tabela 11.</b> Sumário dos valores das constantes obtidas para o ácido gálico e seus derivados numa mistura binária 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato) e numa emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato). ....	61
<b>Tabela 12.</b> Percentagem (em valor aproximado) do ácido gálico e dos seus derivados para as frações de emulsionante de 0,005 e 0,042, nas três regiões da emulsão. ....	63
<b>Tabela 13.</b> Percentagem (em valor aproximado) do ácido gálico e dos seus derivados para as frações de emulsionante de 0,005, 0,01 e 0,02, nas três regiões da emulsão. ....	69
<b>Tabela 14.</b> Valores das absorvâncias obtidas para cada uma das amostras contendo ácido gálico.....	85

<b>Tabela 15.</b> Valores das absorvâncias obtidas para a amostra contendo galato de metilo. ....	87
<b>Tabela 16.</b> Valores das absorvâncias obtidas para cada uma das amostras contendo galato de propilo. ....	88
<b>Tabela 17.</b> Valores das absorvâncias obtidas para as amostras retiradas de misturas binárias contendo galato de butilo.....	89
<b>Tabela 18.</b> Tempo para que as emulsões contendo 1% de emulsionante atingissem o conteúdo em CD de 0,5%. ....	97
<b>Tabela 19.</b> Tempo para que as emulsões contendo 0,5%, 1% e 2% de emulsionante atingissem o conteúdo em CD de 0,5%. ....	99



# ***Lista de Abreviaturas***

**PUFA's** – Ácidos gordos polinsaturados

**EPA** – Ácido eicosapentaenoico

**DHA** – Ácido docosa-hexaenoico

**AOs** – Antioxidantes

**ROOH** – Hidroperóxidos

**M<sup>+</sup>** - Iões metálicos

**RO<sup>•</sup>** - Radical alcóxido

**ROO<sup>•</sup>** - Radical peróxido

**RH** – Ácido gordo insaturado

**R<sup>•</sup>** - Radical livre do ácido gordo

**BHA** – Butilhidroxianisol

**BHT** – 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol

**O/A** – Emulsão óleo em água

**A/O** – Emulsão água em óleo

**$P_A^O$**  - Constante de partição de um antioxidante entre as regiões aquosa e oleosa

**AO<sub>o</sub>** – Fração de antioxidante na região oleosa

**AO<sub>A</sub>** – Fração de antioxidante na região aquosa

**$P_O^I$**  - Constante de partição de um antioxidante entre as regiões oleosa e interfacial

**$P_A^I$**  - Constante de partição de um antioxidante entre as regiões aquosa e interfacial

**16ArN<sub>2</sub><sup>+</sup>** – catiões hexadecilbenzenodiazônio

**$k_{obs}$**  – Constante de velocidade observada

**AO<sub>I</sub>** – Fração de antioxidante na região interfacial

**MCP** – Modelo cinético da pseudofase

**MCPS** – Modelo cinético da pseudofase simplificado

***$k_i$***  – constante de velocidade na região interfacial

**GA** – Ácido gálico

**MG** – Galato de metilo

**PG** – Galato de propilo

**BG** – Galato de butilo

**OG** – Galato de octilo

**LG** – Galato de dodecilo ou galato de laurilo

**NED.2HCl** – Dicloroidatro de N-(Naft-1-til) etilenodiamina

**BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O** – Eterato de trifluoreto de boro

**BuONO** – n-butil nitrito

**THF** – Tetrahidrofurano

**DPPH<sup>•</sup>** - Radical 2,2–difetil-1–picrihidrazilo

**CD** – Dienos conjugados

**Abs** – Absorvância

# Capítulo 1 – Introdução

## 1.1. Oxidação Lipídica

Os óleos e gorduras alimentares são constituídos por uma mistura de tri, bi, di e monoacilgliceróis, ácidos gordos, glicolípidos, fosfolípidos, esteróis, entre outras substâncias.

Os lípidos apresentam um papel importante no que diz respeito à qualidade alimentar de certos alimentos e às propriedades organoléticas que os tornam apetecíveis. Além disso, contribuem para o valor nutritivo dos produtos alimentares [2].

Os ácidos gordos polinsaturados ómega-3 (PUFA's), especialmente o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosa-hexaenoico (DHA) (Figura 1), são conhecidos como portadores de alguns benefícios para a saúde.

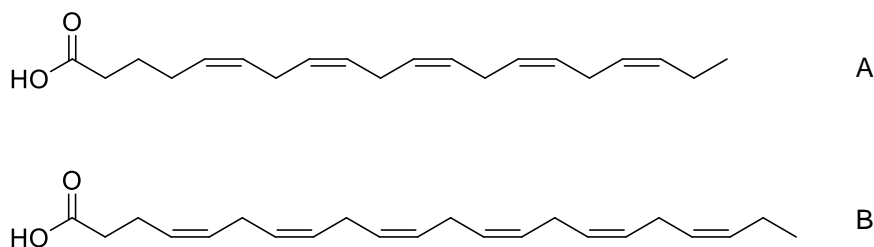


Figura 1. Estrutura química das moléculas de EPA (A) e DHA (B).

Os primeiros sinais destes benefícios foram observados, em 1972, quando Bang e Dyerberg descobriram que uma elevada ingestão de lípidos marinhos resultava numa baixa taxa de incidência de doenças cardíacas nos esquimós da Gronelândia. Desde essa altura, o interesse nos benefícios dos PUFA's ómega-3 tem vindo a ser alvo de pesquisas [3].

Apesar do EPA e do DHA poderem ser sintetizados no organismo humano a partir do ácido linolénico (um ácido gordo essencial) estes ácidos gordos polinsaturados nalguns casos não são sintetizados em níveis suficientes devido em parte ao baixo consumo de alimentos ricos em ácido linolénico, sendo a sua principal fonte externa o peixe e produtos marinhos [3].

Deste modo, em países onde há défice de peixe e de alimentos enriquecidos em ómega-3, a incorporação de óleo de peixe nos alimentos tem vindo a crescer. Contudo, esta incorporação diminui a estabilidade dos alimentos que os contém devido à oxidação do EPA e do DHA. Estes dois ácidos gordos são mais suscetíveis à oxidação lipídica do que os PUFA's encontrados nos óleos vegetais devido ao elevado número de insaturações [3].

A oxidação dos lípidos insaturados tem sido uma das áreas mais estudadas, e continua a ser, uma vez que está relacionada com a alteração dos alimentos com produção, tanto de substâncias que conferem aromas e cores indesejáveis, como de produtos de degradação indesejáveis e tóxicos que reagem com outros constituintes dos alimentos. Este problema é agravado pelo facto de estas reações poderem ser catalisadas e aceleradas por diversos fatores incluindo os metais, as enzimas, os antioxidantes (AOs), o pH dos alimentos e a exposição a fatores externos como a temperatura e a luz [4].

A deterioração dos lípidos pode ocorrer por diversos processos:

- 1) Oxidação enzimática
- 2) Reações hidrolíticas
- 3) Reações com o oxigénio atmosférico – Autooxidação e Fotooxidação

### **1) Oxidação enzimática**

As lipoxigenases, enzimas que provocam a oxidação lipídica, atuam sobre os ácidos gordos polinsaturados, catalisando a adição de oxigénio à cadeia hidrocarbonada polinsaturada. Desta reação resulta a formação de hidroperóxidos com ligações duplas conjugadas instáveis que podem formar radicais e desencadear reações indesejáveis [3].

### **Reações hidrolíticas**

As reações hidrolíticas são catalisadas pela enzima lipase ou através da ação da temperatura e humidade, formando-se ácidos gordos livres [3].

## Reações com o oxigénio atmosférico

### i) Autoxidação

A reação espontânea do oxigénio atmosférico com os lípidos, conhecida por autoxidação, é o processo mais comum que leva à sua decomposição oxidativa. Os ácidos gordos polinsaturados são potencialmente decompostos por este processo, quer quando se encontram sob a forma de ácidos gordos livres como quando estão presentes na composição dos triglicerídeos ou fosfolípidos [5].

A autoxidação ocorre em três etapas distintas, a iniciação, a propagação e a finalização.

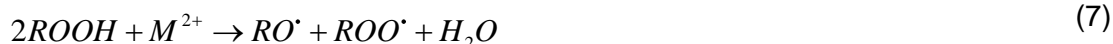
**Iniciação** - nesta etapa ocorre a formação dos radicais livres do ácido gordo insaturado (RH) pela perda de um átomo de hidrogénio no carbono  $\alpha$ , numa reação catalisada pela ação da temperatura e da luz.



**Propagação** – na etapa da propagação os radicais livres do ácido gordo, formados na etapa anterior, ( $R^{\bullet}$ ), são suscetíveis ao ataque do oxigénio atmosférico, originando outros radicais livres peróxido ( $ROO^{\bullet}$ ), cuja estrutura depende da natureza dos ácidos gordos presentes.

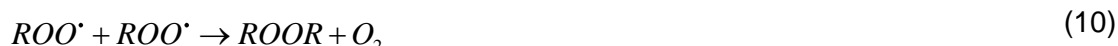


Estes novos radicais atuam como propagadores da reação, formando-se novos hidroperóxidos ( $ROOH$ ), até se esgotarem os ácidos gordos insaturados (RH) ou até os radicais livres se inativarem uns aos outros. Os iões metálicos ( $M^+$ ,  $M^{2+}$ ) estão muitas vezes implicados na etapa de propagação desta reação, catalisando a decomposição homolítica dos hidroperóxidos ( $ROOH$ ) dos lípidos produzindo radicais alcóxido ( $RO^{\bullet}$ ) ou peróxido ( $ROO^{\bullet}$ ) que, por sua vez, podem iniciar novas reações de oxidação [4].



Este mecanismo provoca ainda alterações nos produtos alimentares que prejudicam as suas funções nutricionais, não só devido à degradação de ácido gordos essenciais como também à degradação oxidativa de vitaminas [6].

**Finalização** – na última etapa, dois radicais livres combinam-se originando produtos estáveis (produtos secundários da oxidação), resultantes da cisão e do rearranjo dos hidroperóxidos ( $ROO^{\bullet}$ ) [2].



Os produtos primários da autooxidação, os monohidroperóxidos ( $ROOH$ ), não têm grande repercussão direta no aroma e odor dos alimentos. A qualidade sensorial dos produtos alimentares não é afetada até se formarem compostos voláteis (aldeídos, cetonas e álcoois) – produtos secundários - originários da decomposição dos hidroperóxidos, que são responsáveis pelo aparecimento do odor a ranço [7].

É possível evitar a autooxidação dos óleos diminuindo a incidência dos fatores que a favorecem tentando manter ao mínimo os níveis de energia e a temperatura, que são os principais responsáveis pelo desencadeamento do processo de oxidação lipídica e formação dos radicais livres. Além disso, pode recorrer-se ao uso de bloqueadores da formação de radicais livres, como os antioxidantes, os quais, em pequenas quantidades, não interferem na composição dos óleos e inibem a oxidação dos lípidos [2].

## ii) Fotoxidação

Este mecanismo é promovido, essencialmente, pela radiação UV na presença de foto-sensibilizadores e envolve a participação de oxigénio singleto ( $^1O_2$ ) como intermediário reativo. O processo envolve reações radicalares, cujo resultado é a

formação de hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência de luz e sensibilizadores e, que por degradação posterior originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos [8].

Vários fatores influenciam as reações de fotoxidação sendo os principais a estrutura do sensibilizador e a concentração e a estrutura do substrato disponível para a oxidação [7]. Existem dois tipos de sensibilizadores envolvidos nas reações de fotoxidação:

**Sensibilizadores do Tipo I:** são aqueles que, quando ativados pela luz ( $^1Sens^*$ ) reagem diretamente com o substrato lipídico (RH) ou por transferência eletrónica formando radicais que, posteriormente, reagem com o oxigénio [7].



**Sensibilizadores do Tipo II:** são os sensibilizadores que, estando no seu estado tripleto, transferem energia ao oxigénio, formando-se oxigénio singleto, que, por sua vez, vai reagir com lípidos insaturados [7].



### 1.1.1. Fatores que influenciam a velocidade da oxidação lipídica em alimentos

As reações de oxidação lipídica ocorrem por meio de mecanismos reacionais diversos e extremamente complexos. Estes mecanismos encontram-se diretamente relacionados com o tipo de estrutura e com o meio onde o lípido se encontra. São vários os fatores que determinam a estabilidade oxidativa dos lípidos, tais como a natureza e o número de insaturações neles presentes, o tipo de interface existente entre os lípidos

e o oxigénio atmosférico, a exposição à luz e ao calor e a presença de pró-oxidantes ou de antioxidantes [2].

A velocidade da reação aumenta com o grau de insaturação, ou seja, quantas mais ligações insaturadas contiver o lípido, mais rápida a reação de oxidação [4]. Os óleos vegetais de uso alimentar (óleo de soja, amendoim milho, etc.) possuem níveis de insaturação mais elevados tendo na sua constituição grandes percentagens de ésteres dos ácidos gordos polinsaturados dos 18:2 e 18:3. As gorduras de animais terrestres contém níveis mais altos de glicerídeos de ácidos gordos saturados (ácido palmítico (16:0) e esteárico (18:0)). Os óleos de animais marinhos são os que apresentam maior teor de ácidos gordos polinsaturados sendo normalmente ricos em ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosa-hexaenoico (DHA), ácido oleico (18:1) e ácido palmítico (16:2). [9, 10].

Sendo a velocidade de autooxidação dependente do número de ligações duplas presentes no lípido, seria de esperar que os óleos vegetais que possuem níveis mais elevados de ésteres de ácidos gordos polinsaturados exibissem maior suscetibilidade à deterioração relativamente às gorduras de origem animal terrestre. No entanto, verifica-se que muitas vezes os óleos vegetais tendem a oxidar mais lentamente porque contém quantidades significativas de tocoferóis, os quais atuam como antioxidantes naturais [9].

O mecanismo de oxidação varia também com a temperatura. Assim a temperaturas mais elevadas as reações de polimerização e ciclização são importantes, mas à temperatura ambiente são insignificantes [11].

A luz é outro dos fatores determinantes na estabilidade oxidativa dos lípidos. Sabe-se que compostos minoritários, como a clorofila no azeite virgem, podem ser excitados eletronicamente devido à absorção de luz. A prevenção da fotooxidação durante o armazenamento dos alimentos é importante para assegurar a sua elevada estabilidade oxidativa [12].

## **1.2. Adição de antioxidantes: estratégia para inibir a oxidação lipídica**

O principal processo de deterioração dos alimentos é a oxidação lipídica e a decomposição dos produtos da oxidação que resulta numa diminuição do valor nutricional e qualidade sensorial dos alimentos. Este processo de oxidação pode ser



inibido por vários métodos incluindo a prevenção do acesso do oxigénio aos alimentos, a utilização de temperaturas mais baixas, a inativação de enzimas catalisadoras da oxidação, a redução da pressão do oxigénio e ainda o uso de embalagens adequadas para o armazenamento dos produtos alimentares. Outra forma de proteger os alimentos é utilizar espécies que inibem a sua oxidação. Estes aditivos são designados por inibidores da oxidação, os antioxidantes e representam uma classe de substâncias que variam na sua estrutura química e podem apresentar diferentes mecanismos de ação. O mecanismo mais vulgar da sua ação é a reação com os radicais livres dos lípidos, formando produtos inativos. Normalmente reagem com os radicais peroxilo ou alcóxilo, formados a partir da decomposição dos hidroperóxidos [5].

Os antioxidantes nos alimentos podem ser definidos como qualquer substância que é capaz de retardar, inibir ou prevenir o desenvolvimento de rancidez nos alimentos, ou outro tipo de deterioração provocada pela oxidação, através do alargamento do período de indução deste processo [5]. Alguns antioxidantes existem naturalmente nos alimentos, destacando-se o ácido ascórbico (Vitamina C), que existe no sumo de limão, laranja e outros frutos, os tocoferóis (Vitamina E), que existem nos óleos vegetais, o ácido láctico dos iogurtes e o ácido cítrico dos citrinos [13].

Existem dois meios através dos quais os antioxidantes podem atuar: por eliminação dos radicais livres, no caso de se tratar de antioxidantes primários, ou por um mecanismo que não envolve eliminação direta dos radicais, designados então por antioxidantes secundários [5].

Os antioxidantes primários são normalmente dadores de hidrogénio (H) que retardam ou inibem a etapa de iniciação ou interrompem a etapa de propagação da autooxidação. Estes antioxidantes (AH) reagem com os lípidos e com os radicais peroxilo e alcóxilo e convertem-nos em produtos não-radicalares mais estáveis. Doam um átomo de hidrogénio aos radicais lipídicos produzindo derivados lipídicos e um radical do antioxidante (A<sup>•</sup>) que é, no entanto, mais estável e menos reativo que o radical lipídico.



Os fenóis são bons candidatos a antioxidantes primários, no entanto nem todos apresentam atividade antioxidante. Quando se fazem substituições nas posições 2, 4 ou 6 do anel aromático ocorre um aumento da densidade eletrónica no grupo hidroxilo através de um efeito indutivo que, por sua vez, provoca o aumento da reatividade com radicais lipídicos. O radical formado através da reação do fenol com um radical lipídico

é estabilizado por deslocalização de eletrões desemparelhados que se deslocam em torno do anel aromático (Figura 2).

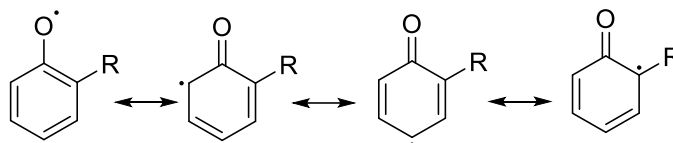


Figura 2. Estabilização do radical fenóxido por deslocalização eletrónica.

A introdução de um segundo grupo hidroxilo na posição 2 ou 4 do anel fenólico aumenta a atividade antioxidante (Figura 3) [14].

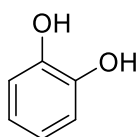


Figura 3. Estrutura do catecol.

Os catecois, 1,2-dihidroxibenzeno e os seus derivados apresentam uma atividade antioxidante mais acentuada em comparação aos orto-metoxifenóis uma vez que podem doar dois hidrogénios e dar origem a produtos não radicalares, normalmente quinonas.

O que faz variar a atividade verificada no catecol daquela que se observa nos orto-metoxifenóis é a elevada estabilização do radical formado a partir do catecol [15]. A eficácia do catecol aumenta com a estabilização do radical fenólico através de ligações de hidrogénio intramoleculares que não são possíveis de ocorrer nos orto-metoxifenóis. Por outro lado, ao contrário dos catecois, os o-metoxifenóis apenas conseguem ceder um hidrogénio para neutralizar um radical. (Figura 4) [14].

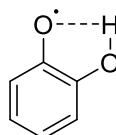


Figura 4. Estabilização do radical por ligações de hidrogénio intramoleculares.

Os antioxidantes secundários apresentam a capacidade de diminuir a velocidade da oxidação por diferentes mecanismos que não convertem os radicais livres em produtos mais estáveis. Os antioxidantes secundários podem: quelatar metais pro-oxidantes e desativá-los; repor o hidrogénio nos antioxidantes primários; decompor os hidroperóxidos em espécies não-radicalares; desativar o oxigénio singlete; absorver radiação ultravioleta; ou aprisionar o oxigénio. Estes antioxidantes são também

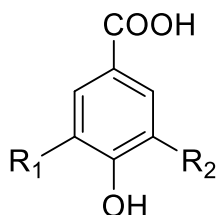
conhecidos como sinérgicos uma vez que promovem a atividade dos antioxidantes do tipo primário. Ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido tartárico são bons exemplos de antioxidantes secundários [16].

Na indústria alimentar tem-se verificado uma evidente tendência na utilização de aditivos alimentares. Alguns AOs naturais residem nos alimentos podendo, no entanto, outros antioxidantes ser-lhes adicionados ou surgirem como resultado do processo de processamento térmico. Os antioxidantes alimentares naturais, como o ácido ascórbico e o ácido cítrico, são usados largamente na indústria. Recentemente, têm sido efetuados numerosos estudos focados no isolamento e identificação de antioxidantes de origem natural. A principal vantagem da utilização de substâncias de origem natural nos alimentos é a de serem considerados mais seguros, sendo melhor aceites pelo consumidor, e não necessitarem de testes tão rigorosos como os antioxidantes de origem sintética [16].

Apesar da pouca aceitação por parte do consumidor, antioxidantes sintéticos são adicionados intencionalmente aos alimentos para inibir ou retardar a oxidação lipídica. Vários antioxidantes têm vindo a ser aprovados para o uso em alimentos como o butilhidroxianisol (BHA), o 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT), e os galatos como o PG, OG e LG, entre outros. Estes compostos fenólicos representam alguns dos mais antigos e frequentes antioxidantes utilizados nos alimentos [16].

### 1.2.1. Ácidos fenólicos

A natureza dos polifenóis varia desde moléculas simples como o fenol, o cresol, o resorcinol e o ácido gálico, até compostos altamente polimerizados como os taninos. Estes compostos contêm um grande número de grupos hidroxilo em anéis aromáticos, entre outros grupos funcionais. Alguns exemplos de ácidos fenólicos, além do ácido gálico, são o ácido vanílico e o ácido sirínico, que são antioxidantes hidrofílicos que estão presentes em frutos, vegetais, especiarias e ervas [17].



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Ácido fenólico
OCH <sub>3</sub>	H	Ácido vanílico
OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Ácido sirínico
OH	OH	Ácido gálico

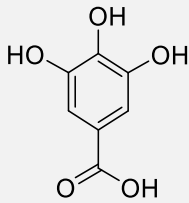
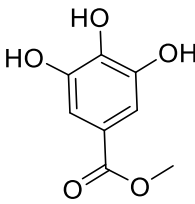
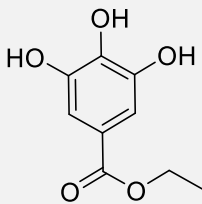
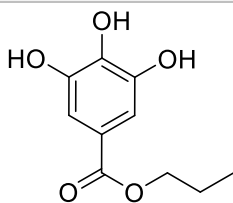
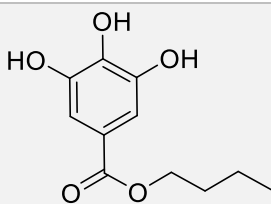
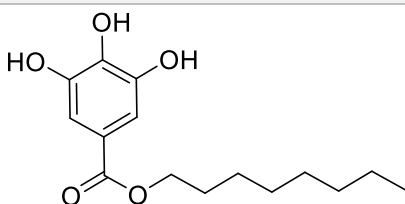
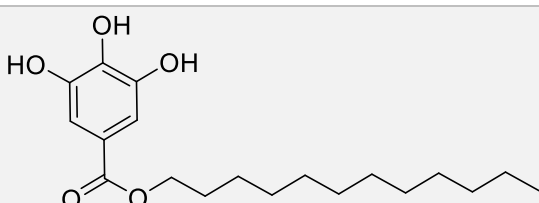
Figura 5. Estrutura química dos derivados do ácido benzóico.

### 1.2.2. Ácido Gálico

O ácido gálico (ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico) é um composto fenólico de origem natural que se encontra amplamente distribuído nas plantas. Na bibliografia encontra-se descrita a sua atividade anti-imunológica, anticarcinogénica e antioxidante [18, 19]. A partir deste composto podem ser sintetizados por esterificação os derivados galato de metilo, etilo, etc. Os galatos são substâncias antioxidantes que se utilizam como conservantes em cosméticos, alimentos e na indústria farmacêutica para prevenir a oxidação das gorduras, vitaminas, perfumes e óleos, evitando desta forma que adquiram um aspeto rançoso e um odor desagradável. Do ponto de vista químico, são ésteres de álcoois de cadeia linear do ácido gálico que se diferenciam entre si pela extensão da cadeia lateral. A esterificação permite melhorar a solubilidade do GA em gorduras e óleos [20].

Estes aditivos apresentam-se habitualmente sob a forma de sólidos cristalinos brancos ou branco-creme. No entanto, a sua utilização não está isenta de perigos para a saúde reconhecendo-se alguns efeitos secundários, como por exemplo reações alérgicas, principalmente nos asmáticos e em pessoas alérgicas ao ácido acetilsalicílico. A sua perigosidade é elevada para bebés e crianças e está proibida a respetiva utilização em alimentos específicos para essas faixas etárias. Na Tabela 1, encontram-se os galatos autorizados e mais utilizados como aditivos alimentares [13]. São aplicados essencialmente em banha, óleos e gorduras para fritar, óleos de peixe, entre outras. Deste modo é necessária a otimização da utilização destes aditivos de modo a serem utilizadas concentrações o mais baixas possível sem diminuir a sua eficácia antioxidante.

Tabela 1. Estrutura química do ácido gálico e dos seus derivados fazendo referência aos galatos autorizados como antioxidantes [13, 21].

Nº E	Designação	Fórmula Química	Estrutura
	<b>Ácido gálico (GA)</b>	$C_7H_6O_5$	
	<b>Galato de metilo (MG)</b>	$C_8H_8O_5$	
	<b>Galato de etilo (EG)</b>	$C_9H_{10}O_5$	
<b>E310</b>	<b>Galato de propilo (PG)</b>	$C_{10}H_{12}O_5$	
	<b>Galato de butilo (BG)</b>	$C_{11}H_{12}O_5$	
<b>E311</b>	<b>Galato de octilo (OG)</b>	$C_{15}H_{22}O_5$	
<b>E312</b>	<b>Galato de dodecilo (LG)</b>	$C_{19}H_{30}O_5$	

### 1.3. Otimização da eficácia antioxidante em emulsões: importância da distribuição do antioxidante

Uma emulsão é constituída por dois líquidos imiscíveis, óleo e água, na qual um deles se encontra disperso no outro sob a forma de pequenas gotas. As emulsões são termodinamicamente instáveis uma vez que necessitam de energia para aumentar a área superficial entre a fase aquosa e a fase oleosa.

Para preparar uma emulsão que seja cineticamente estável por um longo período de tempo, é necessário adicionar um emulsionante também designado por surfactante. Os emulsionantes são moléculas anfifílicas que são constituídas por um grupo polar e por um grupo apolar, que se orientam na região interfacial da emulsão, formando uma membrana protetora que cobre a fase dispersa evitando deste modo a agregação das gotículas.

Existem dois tipos distintos de emulsão (Figura 6), óleo em água (O/A) – nas quais as gotas de óleo estão dispersas numa fase aquosa contínua; e água em óleo (A/O) – nas quais as gotas de água se encontram dispersas numa fase oleosa contínua [22].

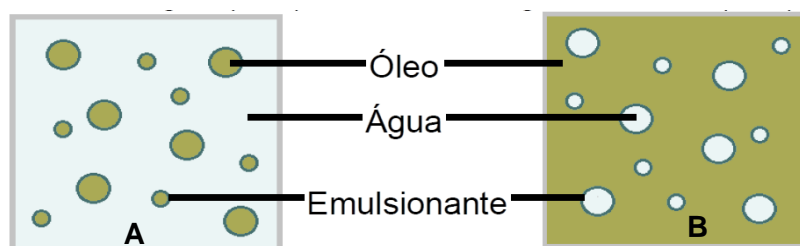


Figura 6. Emulsão óleo em água (O/A) (A) e água em óleo (A/O) (B).

A oxidação lipídica em sistemas multifásicos é amplamente influenciada pela natureza da região interfacial que é afetada pela composição das fases oleosa e aquosa e dos solutos nela presentes (antioxidantes, etc.) [22]. A composição da região aquosa é um fator bastante importante para a oxidação das emulsões uma vez que, os componentes desta região podem atuar como antioxidantes ou pro-oxidantes dependendo das suas propriedades químicas, das condições ambientais e ainda das interações que efetuam com os componentes lipídicos do óleo.

A atividade antioxidante depende da estrutura química dos antioxidantes e das suas interações dentro da emulsão. *Porter (1993) [23]*, descreveu pela primeira vez o “Paradoxo Polar” como um fenómeno no qual:

- ✓ Os antioxidantes hidrofílicos ofereciam uma melhor proteção em óleos e emulsões água/óleo do que em emulsões óleo/água;
- ✓ Tornar os compostos fenólicos mais lipofílicos aumenta a eficácia do antioxidante em emulsões óleo/água comparando com o composto original [24].

Posteriormente Frankel et al (1994) [25] tentaram explicar o Paradoxo Polar introduzindo o conceito de fenómeno interfacial (Figura 7) e apontando para a importância das interfaces como o local onde ocorrem preferencialmente os fenómenos de oxidação. Assim, os AOs mais lipofílicos representados na Figura 7 por ●, encontravam-se maioritariamente dissolvidos na região oleosa ao passo que os hidrofílicos, representados na mesma figura por ●, situavam-se, na maior parte das vezes, dissolvidos na aquosa e deste modo longe das interfaces ar/óleo ou óleo/água, onde se julga acontecerem a maior parte das reações de oxidação.



Figura 7. Ação do antioxidante em emulsões O/A (A) e emulsões A/O (B).  
●- AO hidrofílico; ●- AO lipofílico

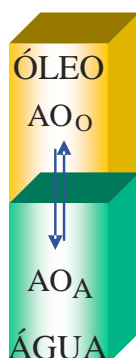
Recentemente foram realizados estudos [24, 26] para perceber qual a influência da hidrofobicidade na eficácia dos AOs. Verificou-se que antioxidantes que apresentam o mesmo anel fenólico, mas diferentes hidrofobicidades, como os ésteres derivados do ácido gálico, não apresentam a mesma eficácia do ácido uma vez que se incorporam, em maior percentagem na interface. Verificou-se igualmente que a eficácia aumenta, com o tamanho da cadeia alquílica, até uma determinada hidrofobicidade, a partir da qual diminui [3].

Estes resultados indicaram a não existência de relação linear entre a polaridade e a eficácia de um antioxidante em emulsões tendo este comportamento sido apelidado de efeito “Cut-off”. Este efeito sugere que a lipofilização apenas aumenta a eficácia AO até uma cadeia alquílica intermédia, sublinhando a importância da localização do AO dentro do sistema, isto é, a distribuição do AO entre as diferentes regiões da emulsão [27].

## 1.4. Distribuição de AOs em emulsões alimentares modelo

### 1.4.1. Partição de antioxidantes em emulsões

Para avaliar em termos quantitativos a distribuição de um antioxidante numa mistura binária, entre duas fases não miscíveis, utiliza-se a constante de partição,  $P_A^O$ , definida pela expressão 18, na qual  $AO_O$  representa a fração de antioxidante presente na fase oleosa e  $AO_A$  a fração presente na fase aquosa, como representado na Figura 8 [28].



$$P_A^O = \frac{(AO_O)}{(AO_A)} \quad (18)$$

Figura 8. Esquema representativo de uma mistura binária O/A.

No entanto, a determinação da distribuição de um antioxidante em emulsões é muito mais complexa do que a sua determinação em misturas binárias uma vez que as emulsões apresentam ambientes químicos diferentes em três regiões distintas, região aquosa, interfacial e oleosa. A partição do antioxidante nas três regiões depende da solubilidade relativa do antioxidante em cada uma delas e do volume da região no total da emulsão. No geral, para um sistema emulsionado a percentagem de antioxidante em cada região depende de vários parâmetros tais como a polaridade do antioxidante, a natureza do emulsionante e outros fatores como a temperatura e a acidez [29]. Estimando a constante de partição  $P_A^O$  apenas se consegue quantificar o antioxidante na fase oleosa e na fase aquosa, não se obtendo assim qualquer informação acerca da sua distribuição na região desenvolvida pela presença do emulsionante, a interface [30].



Existindo então três regiões onde o antioxidante se pode distribuir, para avaliar a sua distribuição num sistema emulsionado, requerem-se duas constantes de partição: a que define a distribuição entre as regiões oleosa e interfacial,  $P_O^I$  e a que define a distribuição entre as regiões aquosa e interfacial,  $P_A^I$ . Ambas as constantes são definidas pelo quociente entre as concentrações em cada uma das fases, como mostram as Equações 19 e 20 [29, 30].

$$P_O^I = \frac{(AO)_I}{(AO)_O} \quad (19)$$

$$P_A^I = \frac{(AO)_I}{(AO)_A} \quad (20)$$

Note-se que, com o quociente entre as duas constantes de partição,  $P_O^I$  e  $P_A^I$ , chega-se à expressão utilizada para calcular a constante de partição binária,  $P_A^O$ , como se pode verificar pela Equação 21.

$$P_A^O = \frac{P_A^I}{P_O^I} = \frac{(AO_I)/(AO_A)}{(AO_I)/(AO_O)} = \frac{(AO_O)}{(AO_A)} \quad (21)$$

onde, os índices I, O e A representam as regiões interfacial, oleosa e aquosa, respetivamente, e os parêntesis indicam concentrações em moles por litro no volume da região considerada.

A região interfacial formada nos sistemas emulsionados não é fisicamente possível de separar das duas outras regiões. Por esse motivo, os valores de  $P_O^I$  e  $P_A^I$  não podem ser determinados independentemente a partir da distribuição da concentração do antioxidante por cada uma das fases consideradas. A determinação destas duas constantes de partição deve ser então realizada na própria emulsão [28].

Foi desenvolvido um método cinético que permite estimar as constantes de partição dos antioxidantes, em emulsões opacas e sem isolamento de fases, entre as regiões aquosa e interfacial e as regiões oleosa e interfacial. A base deste método é o modelo cinético da pseudofase para microemulsões termodinamicamente estáveis. Utiliza a reação entre catiões hexadecilbenzenodiazonio,  $16\text{-ArN}_2^+$ , e os antioxidantes em estudo [31].

## 1.4.2. Método cinético utilizado para determinar a distribuição de antioxidantes em emulsões – Fundamento teórico

### 1.4.2.1. Modelo cinético da pseudofase (MCP) estendido a emulsões

Na sua conceção original, o modelo cinético da pseudofase foi desenvolvido para sistemas micelares e, basicamente, pressupõe a existência de duas pseudofases diferentes (Figura 9) a pseudofase micelar e a pseudofase aquosa [30].

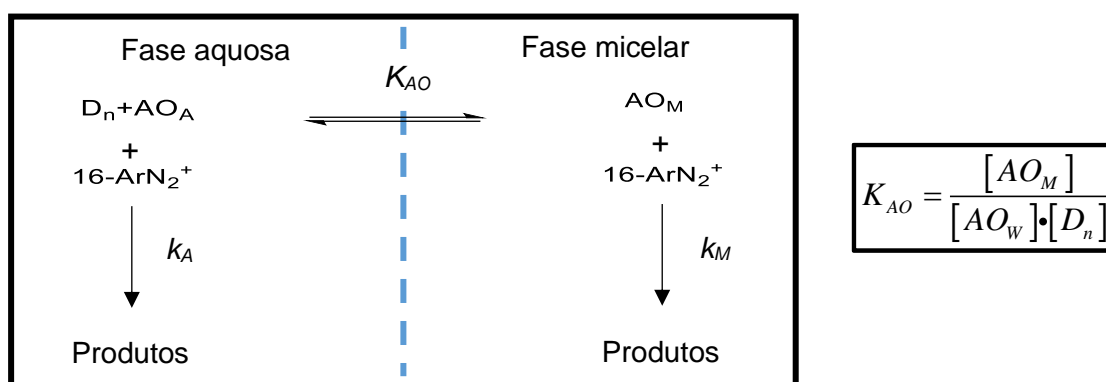


Figura 9. Esquema representativo das duas pseudofases que constituem um sistema micelar e expressão que permite o cálculo da constante da distribuição do AO nas duas regiões.

$D_n$  – concentração de surfactante micelado;  $AO_O$  – concentração de AO na fase oleosa;  $AO_A$  – concentração de AO na fase aquosa;  $k_A$  – constante de velocidade da reação na fase aquosa;  $k_M$  – constante de velocidade da reação na região micelar.

O modelo cinético da pseudofase assume que a distribuição dos antioxidantes em estudo é rápida na escala de tempo da sua reatividade química, o que significa que, no caso de ocorrer alguma reação química, o antioxidante se encontra em equilíbrio enquanto esta ocorre. Assim, o antioxidante pode reagir tanto na fase aquosa como na fase oleosa, sendo a velocidade total da reação a soma das velocidades em cada uma das regiões [32].

As emulsões são constituídas por três regiões distintas e não miscíveis: a região aquosa, região oleosa e a região interfacial.

O volume da região aquosa e da região oleosa é muito superior ao volume da região interfacial, sendo esta última composta essencialmente pelo emulsionante utilizado, água e óleo. Para aplicar o MCP, pressupõe-se a aplicação das seguintes hipóteses:

- A distribuição dos reagentes entre as regiões, numa emulsão, encontra-se em equilíbrio dinâmico, ou seja, a velocidade do transporte dos reagentes entre as regiões é maior do que a velocidade da reação do antioxidante com os catiões do sal de arenodiazónio.
- A distribuição do antioxidante entre o óleo, a água e a interface depende da solubilidade relativa em cada região e não do tamanho e da forma das gotas formadas na emulsão, ou do tipo da emulsão (óleo em água ou água em óleo) [28].

Como já foi referido, a distribuição do antioxidante em estudo, num sistema emulsionado, é determinada pelas duas constantes de partição, uma entre a região aquosa e a região interfacial,  $P_A^I$ , e outra entre a região oleosa e a região interfacial,  $P_O^I$ . Se se assumir que, o volume de emulsionante se encontra na totalidade na região interfacial, então o valor numérico do volume desta região é idêntico aos volumes de óleo, água e emulsionante, utilizados na preparação de cada uma das emulsões [28].

Aplicando este modelo cinético e, ocorrendo a reação do antioxidante com os iões 4-hexadecilbenzenodiazonio ( $16\text{-ArN}_2^+$ ), pode-se expressar a velocidade global da reação através do somatório das velocidades nas diferentes regiões que constituem a emulsão, esquematizadas na Figura 10.

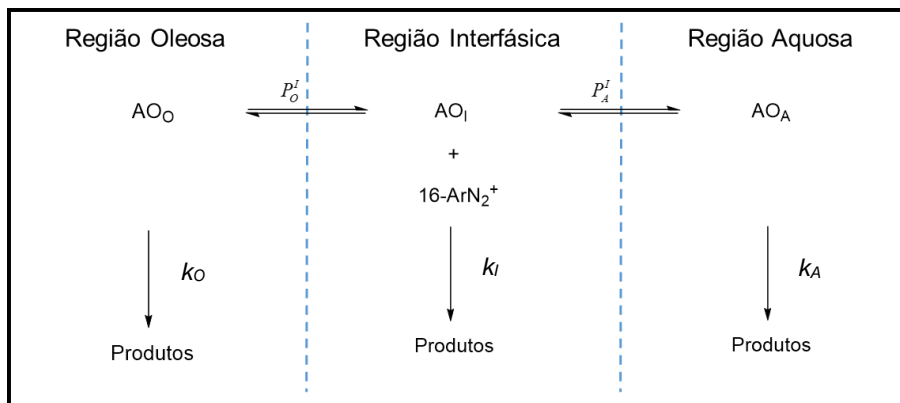


Figura 10. Esquema representativo das três regiões de uma emulsão que contém um AO cuja distribuição vem definida pelas constantes de partição.

A velocidade da reação em cada uma das regiões de uma macroemulsão é dada pelo produto da constante de velocidade de segunda ordem com a concentração de cada reagente na região, em moles por litro de volume de região, como se encontra apresentado na Equação 22.

$$v = k \cdot [16 - ArN_{2T}^+] \cdot [AO_T] = k_o \cdot (16 - ArN_{2O}^+) \cdot (AO_O) \cdot \Phi_O + k_I \cdot (16 - ArN_{2I}^+) \cdot (AO_I) \cdot \Phi_I + k_A \cdot (16 - ArN_{2A}^+) \cdot (AO_A) \cdot \Phi_A \quad (22)$$

na qual  $k$  representa a constante de velocidade de segunda ordem;  $[\ ]$  representam a concentração total dos reagentes, em moles por litro, no volume total da emulsão;  $( )$  indicam a concentração dos reagentes, em moles por litro, em cada uma das regiões da emulsão; o índice T refere-se à quantidade total e os índices O, I e A às regiões oleosa, interfacial e aquosa, respetivamente;  $\Phi$  corresponde à fração de volume de cada região e AO representa o antioxidante em estudo [30].

Uma vez que os catiões hexadecilbenzenodiazônio ( $16-ArN_2^+$ ) possuem simultaneamente uma longa cadeia hidrofóbica e um grupo catiónico, são insolúveis tanto no óleo como na água localizando-se apenas na região interfacial onde vão então reagir com o antioxidante (Figura 11) [30].

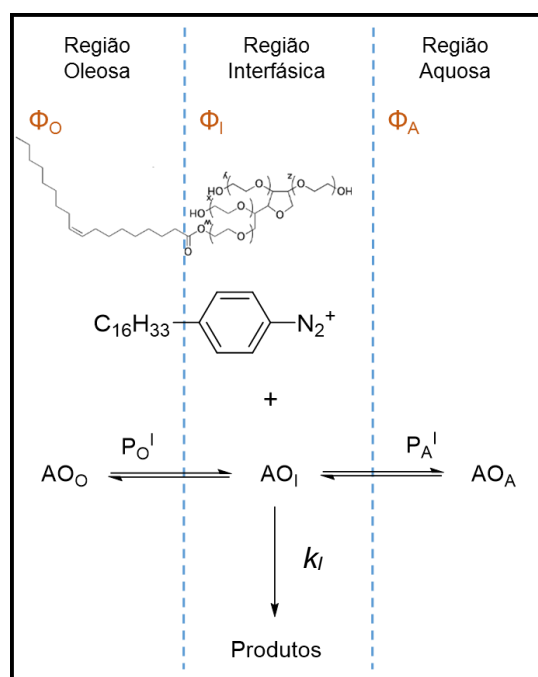


Figura 11. Esquema representativo de uma emulsão:  $\Phi$  indica a fração de volume para cada uma das regiões, AO é o antioxidante, P é a constante de partição,  $k_I$  é a constante de velocidade para a reação dos íons de arenodiazônio na interface com o AO e os índices O, I e A representam a região oleosa, a interfacial e a aquosa, respetivamente.

Considerando então que a concentração dos catiões nas fases oleosa e aquosa é desprezável, a equação da velocidade global da reação pode ser simplificada [30].

$$v = k \cdot [16 - ArN_{2T}^+] \cdot [AO_T] = k_I \cdot (16 - ArN_{2I}^+) \cdot (AO_I) \cdot \Phi_I \quad (23)$$

A Equação 23 descreve qual o efeito do aumento da fração de volume de emulsionante,  $\Phi_I$ , na constante de velocidade da reação. A fração de volume de emulsionante é dada pela Equação 24:

$$\Phi_I = \frac{V_I}{V_O + V_I + V_A} \quad (24)$$

na qual,  $V_I$ ,  $V_A$  e  $V_O$  representam o volume das regiões interfacial, aquosa e oleosa, respetivamente [30].

Para a fase aquosa e para a fase oleosa, as frações de volume definem-se de maneira idêntica àquela apresentada para a região interfacial. A soma das frações de volume das três regiões tem que ser unitária, conforme a Equação 25:

$$\Phi_O + \Phi_I + \Phi_A = 1 \quad (25)$$

Nas Equações 26 e 27 está representado o balanço de quantidade do antioxidante e dos iões arenodiazónio, respetivamente.

$$[AO_T] = \Phi_O(AO_O) + \Phi_I(AO_I) + \Phi_A(AO_A) \quad (26)$$

$$[16 - ArN_{2T}^+] = \Phi_I(16 - ArN_{2I}^+) \quad (27)$$

A combinação das Equações 19, 20 e 26 leva á Equação 28:

$$(AO_I) = [AO_T] \cdot \frac{P_O^I P_A^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_O^I P_A^I + \Phi_A P_O^I} \quad (28)$$

Assumindo que todo o trabalho se desenvolveu em condições de pseudo-primeira ordem, em que  $[AO] \gg [16 - ArN_2^+]$ , a constante de velocidade observada ( $k_{obs}$ ) é dada pela Equação 29.

$$k_{obs} = k \cdot [AO_T] = k_I(AO_I) = \frac{[AO_T] k_I P_A^I P_O^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_O^I P_A^I + \Phi_A P_O^I} \quad (29)$$

Numa visão matemática, a equação anterior (Equação 29) é equivalente à Equação 30 e o inverso de  $k_{obs}$  corresponde à Equação 31 onde a e b são dados pelas Equações 32 e 33.

$$k_{obs} = a / (1 + b\Phi_I) \quad (30)$$

$$1/k_{obs} = 1/a + b/a\Phi_I \quad (31)$$

$$a = \frac{[AO_T]k_I P_A^I P_O^I (1 + \Phi_A / \Phi_O)}{P_A^I + \Phi_A / \Phi_O P_O^I} \quad (32)$$

$$b = \frac{P_A^I P_O^I (1 + \Phi_A / \Phi_O)}{P_A^I + \Phi_A / \Phi_O P_O^I} - 1 \quad (33)$$

A Equação 29 mostra que  $k_{obs}$  diminui com o aumento da fração de volume de emulsionante,  $\Phi_I$ , para uma concentração constante de antioxidante  $[AO]_T$  e  $\Phi_O/\Phi_A$ .

A representação de  $1/k_{obs}$  é linear, com uma ordenada na origem igual a  $1/a$  e um declive igual a  $b/a$ . Através do valor de b, representado na Equação 33, podem retirar-se os valores das constantes de partição  $P_A^I$  e  $P_O^I$  de duas formas distintas:

- A partir de dois valores de b, para dois valores distintos de  $\Phi_A/\Phi_O$  resolvendo - se um sistema de duas equações a duas incógnitas, as quais são as constantes de partição.
- A partir do valor experimental  $P_A^O$ , obtido no estudo da distribuição em sistema binário, e de um valor de b. O quociente das constantes de partição  $P_A^I$  e  $P_O^I$  representa o valor da constante de partição entre a fase aquosa e a fase oleosa, como representado na Equação 34.

$$P_O^A = \frac{P_A^I}{P_O^I} = \frac{(AO_I)/(AO_A)}{(AO_I)/(AO_O)} = \frac{(AO_O)}{(AO_A)} \quad (34)$$

Assim, obtendo experimentalmente o valor da constante de partição do antioxidante entre a fase aquosa e oleosa, determinado para um sistema binário na ausência de emulsionante, e com um valor de b (Equação 33) determinado pela variação do  $k_{obs}$  em função de  $\Phi_I$  para uma determinada razão  $\Phi_A/\Phi_O$ , é possível determinar as constantes de partição  $P_A^I$  e  $P_O^I$  [30].

Uma vez determinados os valores destas constantes, pode-se determinar o valor de  $k_i$ , que representa a velocidade bimolecular para a reação entre os catiões de arenodiazónio e o antioxidante, na interface, aplicando a Equação 32 [30].

A distribuição do antioxidante entre as regiões aquosa, oleosa e interfacial, pode ser determinada pela aplicação das Equações 35, 36 e 37, que surgem da combinação das expressões das constantes de partição com as do balanço de quantidade [31].

$$\% \text{AO}_I = \frac{100\Phi_I P_A^I P_O^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_A^I P_O^I + \Phi_A P_O^I} \quad (35)$$

$$\% \text{AO}_O = \frac{100\Phi_O P_A^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_A^I P_O^I + \Phi_A P_O^I} \quad (36)$$

$$\% \text{AO}_A = \frac{100\Phi_A P_O^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_A^I P_O^I + \Phi_A P_O^I} \quad (37)$$

#### 1.4.2.2. Simplificação do modelo cinético da pseudofase (MCPS)

Alguns antioxidantes apresentam uma solubilidade muito baixa numa das regiões constituintes da emulsão.

No caso em que, numa das fases, os antioxidantes são solúveis na totalidade ou em parte dela, o modelo cinético da pseudofase pode ser simplificado, interpretando-se os resultados com o cálculo de apenas uma constante de partição.

Pode-se então supor que a distribuição do antioxidante tem lugar entre as regiões oleosa e interfacial (solubilidade do AO na região aquosa virtualmente nula) ou entre as regiões aquosa e interfacial (solubilidade do AO na região oleosa virtualmente nula).

Assim, a concentração total de antioxidante, define-se pela Equação 38, para o caso em que o AO se distribuir entre as regiões oleosa e interfacial.

$$[\text{AO}_T] = (\text{AO}_I)\Phi_I + (\text{AO}_O)\Phi_O \quad (38)$$

Na Figura 12 encontra-se a representação da distribuição do AO, na emulsão, entre as regiões oleosa e interfacial.

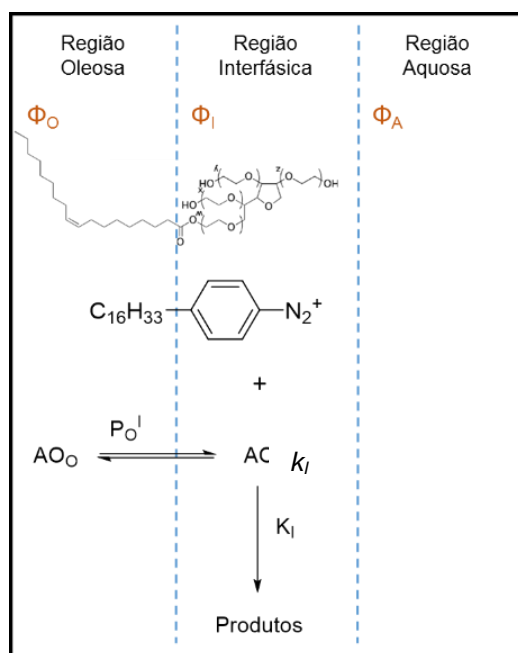


Figura 12. Representação esquemática da região interfacial de uma emulsão com base no modelo cinético da pseudofase que mostra a partição do antioxidante, AO, entre as regiões interfacial e oleosa.

Considerando, para as seguintes deduções, que o antioxidante apenas se distribui entre as regiões oleosa e interfacial (ou seja, assumindo que a solubilidade do AO na região aquosa é virtualmente nula), substituindo a Equação 20 na Equação 38, obtém-se a Equação 39:

$$(AO_I) = \frac{[AO_T]P_O^I}{\Phi_I P_O^I + \Phi_O} \quad (39)$$

Fazendo a substituição desta equação na Equação 27 chega-se à expressão que relaciona a constante de velocidade observada com a constante de partição do antioxidante entre as regiões oleosa e interfacial, representada na Equação 40.

$$k_{obs} = \frac{k_I [AO_T] P_O^I}{\Phi_I P_O^I + \Phi_O} \quad (40)$$

Num contexto matemático, a Equação 40 é equivalente à Equação 41.

$$k_{obs} = \frac{k_I [AO_T] \frac{P_O^I}{\Phi_I}}{1 + \Phi_I \frac{P_O^I}{\Phi_O}} = \frac{ab}{1 + b\Phi_I} \quad (41)$$



na qual os parâmetros  $a$  e  $b$  se definem pelas Equações 42 e 43.

$$b = \frac{P_o^I}{\Phi_o} \quad (42)$$

$$a = k_I[AO_T] \quad (43)$$

Segundo a Equação 41 pode-se prever que a variação de  $1/k_{obs}$  em função de  $\Phi_I$  (Equação 44) é linear, com uma ordenada na origem igual a  $1/ab$  e um declive igual a  $1/a$ .

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{ab} + \frac{1}{a}\Phi_I \quad (44)$$

Fazendo a representação linear de  $1/k_{obs}$  em função de  $\Phi_I$  pode-se obter o valor de  $k_I$  a partir do declive da reta e, combinando o declive com o valor da ordenada na origem, obtém-se o valor de  $P_o^I$ , através da Equação 45.

$$P_o^I = \frac{\Phi_o(declive)}{(ordenada\ na\ origem)} \quad (45)$$

Para calcular a fração de antioxidante presente na fase oleosa e interface aplicam-se as Equações 46 e 47, apresentadas de seguida.

$$\% AO_o = \frac{100\Phi_o}{\Phi_I P_o^I + \Phi_o} \quad (46)$$

$$\% AO_I = \frac{100\Phi_I P_o^I}{\Phi_I P_o^I + \Phi_o} \quad (47)$$

No caso de se considerar que a distribuição do antioxidante é virtualmente nula na fase oleosa, ou seja, o antioxidante distribui-se fundamentalmente nas regiões aquosa e interfacial, pode-se obter, da mesma maneira, uma expressão que relaciona a constante de velocidade observada com a constante de partição do antioxidante entre as regiões aquosa e interfacial. Assim, a concentração total de antioxidante, define-se pela Equação 48.

$$[AO_T] = (AO_I)\Phi_I + (AO_A)\Phi_A \quad (48)$$

A representação esquemática da distribuição do AO nas regiões aquosa e interfacial encontra-se na Figura 13.

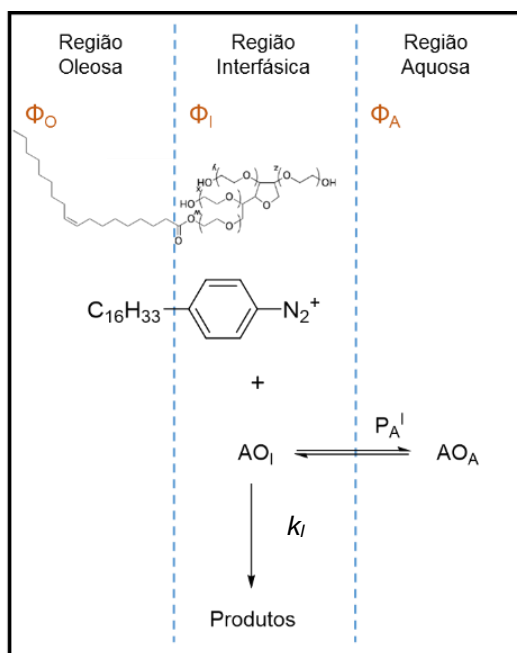


Figura 13. Representação esquemática da região interfacial de uma emulsão com base no modelo cinético da pseudofase que mostra a partição do antioxidante, AO, entre as regiões interfacial e aquosa.

Essa relação está expressa na Equação 49 podendo ser linearizada obtendo-se assim a Equação 50.

$$k_{obs} = \frac{k_I [AO_T] P_A^I}{\Phi_I P_A^I + \Phi_A} \quad (49)$$

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{\Phi_A}{k_I [AO_T] P_A^I} + \frac{\Phi_I}{k_I [AO_T]} \quad (50)$$

Como no caso anterior, fazendo a representação linear de  $1/k_{obs}$  em função de  $\Phi_I$  pode-se obter o valor de  $k_I$  a partir do declive da reta e, combinando o declive com o valor da ordenada na origem, obtém-se o valor de  $P_A^I$ , Equação 51.

$$P_A^I = \frac{\Phi_A (declive)}{(ordenada na origem)} \quad (51)$$

Assim, a percentagem do antioxidante pode ser determinada nas duas regiões, aquosa e interfacial, a partir das Equações 52 e 53 [31].

$$\% \text{AO}_A = \frac{100\Phi_A}{\Phi_I P_A^I + \Phi_A} \quad (52)$$

$$\% \text{AO}_I = \frac{100\Phi_I P_A^I}{\Phi_I P_A^I + \Phi_A} \quad (53)$$

## 1.5. Determinação da atividade antioxidante

A maior parte dos estudos de avaliação da atividade antioxidante de várias moléculas têm sido realizados em óleo. Isto proporciona frequentemente uma boa previsão da atividade antioxidante em óleos e em emulsões de água em óleo, como a margarina. No entanto, esta previsão pode ser bastante distinta da que se obtém quando se utilizam emulsões óleo em água em consequência da distribuição dos AOs na emulsão. Assim, a atividade antioxidante dos compostos depende de vários fatores entre os quais:

- ✓ Fatores dependentes da matriz lipídica: concentração inicial dos produtos primários da autooxidação, tipo de emulsão, presença ou não de metais, entre outros;
- ✓ Fatores físicos: temperatura, exposição a alta pressão de oxigénio, etc;
- ✓ Concentração e atividade antiradicalar do antioxidante.

Deste modo, na avaliação da atividade antioxidante de várias moléculas devem ser utilizadas condições o mais semelhantes possível às que as moléculas terão que enfrentar em condições reais. No entanto, sujeitar as várias moléculas às condições normais de temperatura e armazenamento é normalmente um processo muito demorado e deste modo são utilizados métodos acelerados em que é utilizada uma maior temperatura ou a introdução no sistema de substâncias que aceleram a oxidação.

Na bibliografia estão descritos numerosos métodos para avaliar a capacidade de vários compostos na proteção das emulsões frente à oxidação. Uma das metodologias mais utilizadas no estudo da atividade antioxidante de compostos [33] é o Teste de

estufa de Schaal. Baseia-se no aquecimento das amostras, normalmente a 60°C, numa estufa termostatzada, até que ocorra oxidação. As amostras são analisadas em intervalos de tempo regulares, avaliando-se o estado da oxidação destas por determinação quer dos produtos primários quer dos produtos secundários da oxidação. Geralmente procura-se avaliar o parâmetro designado por “período de indução” em condições padronizadas, ou seja, o tempo necessário para se atingir o ponto crítico da oxidação [8].

### **1.5.1. Avaliação do nível de oxidação**

A avaliação do nível de oxidação de óleos e gorduras é uma determinação muito utilizada a nível industrial. É considerado um meio de conseguir controlar e garantir a qualidade das matérias-primas adquiridas, assim como um método de controlo de qualidade dos produtos comercializados. Existe uma diversidade de métodos físicos, físico-químicos e químicos descritos para a avaliação da estabilidade oxidativa dos óleos e gorduras e cada método fornece determinada informação acerca de um estado particular do processo oxidativo. Uma das maiores dificuldades destes procedimentos está na escolha do momento mais adequado para efetuar a determinação.

Assim, esta determinação deve ser elaborada ao longo de um período de tempo e não num momento exato, de forma a tentar representar o tempo de vida do produto.

A avaliação do nível de oxidação de uma amostra pode-se realizar através da:

- ✓ Análise de produtos primários da oxidação;
- ✓ Análise de produtos secundários da oxidação [8].

#### **1.5.1.1. Métodos baseados na determinação de produtos primários da oxidação**

Há um grupo de métodos baseados na medida dos produtos primários que se originam nas reações de oxidação dos lípidos. A oxidação dos ácidos gordos produz dienos conjugados. Estes produtos podem ser um indicador do avanço da oxidação das moléculas dos ácidos gordos. Os dienos absorvem luz ultravioleta a um comprimento de onda aproximado de 233 nm, pelo que, a sua determinação pode ser efetuada por espectrofotometria de UV [33].

### **1.5.1.2. Métodos baseados na determinação de produtos secundários da oxidação**

Os métodos mais comuns para a determinação dos produtos secundários são o método do ácido tiobarbitúrico (TBARS), o índice de p-anisidina para determinar aldeídos e a determinação por cromatografia gasosa dos compostos voláteis resultantes do processo de oxidação como álcoois, aldeídos, cetonas, entre outros [33].

## **1.6. Avaliação da capacidade antiradicalar**

Um dos mecanismos mais importantes da atividade antioxidante é a captura de radicais livres, dando por finalizada a cadeia de oxidação. O método do DPPH• é um dos métodos mais utilizados para avaliar a reatividade dos antioxidantes frente a radicais, neste caso frente ao radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazil). A redução deste radical, que é corado, pelo AO pode ser medida através da diminuição da absorvância a 515 nm. Assim a atividade antiradicalar expressa-se normalmente através do valor de EC<sub>50</sub>, que representa a concentração de antioxidante necessária para captar metade dos radicais DPPH [33].



# Capítulo 2 – Objetivo

Este trabalho teve como objetivo estudar a distribuição dos antioxidantes ácido gálico (GA) e de alguns dos seus ésteres derivados (de cadeia curta - galato de metilo (MG), cadeia intermédia – galato de propilo (PG) e galato de butilo (BG), e de cadeia longa – galato de octilo (OG) e galato de dodecilo (LG)), assim como a sua eficácia antioxidante em emulsões alimentares modelo contendo alto teor de ómega-3 de modo a permitir a utilização futura mais eficiente destes antioxidantes.

Para tal propósito, foi proposto:

1. Determinar as constantes de partição do GA e dos seus derivados entre as regiões aquosa, oleosa e interfacial, em emulsões ricas em ómega-3 mediante a aplicação de um método cinético
2. Estudar sua a eficácia antioxidante na inibição da oxidação lipídica nas mesmas emulsões
3. Correlacionar a distribuição com a eficácia antioxidante, com a finalidade de contribuir para a seleção do melhor inibidor da oxidação lipídica de um sistema alimentar rico em ómega-3.





# **Capítulo 3 – Métodos e Procedimentos Experimentais**

## **3.1. Determinação da composição da fase oleosa utilizada na preparação das emulsões modelo**

Neste trabalho utilizou-se como fase oleosa o óleo de peixe. Para perceber qual a composição da fase oleosa utilizada analisou-se a composição em ácidos gordos do óleo após a reação de transterificação e obtenção dos respetivos ésteres metílicos. Pesaram-se aproximadamente 200 mg do óleo de peixe utilizado ao longo do estudo para um tudo de hidrólise e adicionaram-se 2 mL de uma mistura  $\text{BF}_3/\text{MeOH}$ . Aqueceu-se a mistura reacional em banho-maria durante 60 minutos. Arrefeceu-se a solução e adicionaram-se 5 mL de éter etílico. Lavou-se com 1 mL água e secou-se a fase oleosa com sulfato de sódio anidro e armazenou-se a amostra a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  até análise.

Injetou-se uma pequena quantidade da amostra ( $1\text{ }\mu\text{L}$ ) no cromatógrafo gasoso (CG) e obteve-se o cromatograma.

## **3.2. Eliminação de antioxidantes naturais presentes no óleo de peixe**

Para estudar a distribuição dos antioxidantes e determinar a sua atividade antioxidante nas emulsões, foi necessário remover alguns constituintes do óleo como os tocoferóis, fazendo-o passar por uma coluna de alumina sob pressão de azoto.

Assim, os tocoferóis do óleo de peixe removeram-se segundo o procedimento descrito por Yoshida [34]. Para tal, utilizou-se uma coluna cromatográfica com alumina como fase estacionária. Ativou-se previamente a alumina (óxido de alumínio 90, 0,056-0,200 mm, Merck) lavando-se com água desionizada. Posteriormente filtrou-se a vácuo e secou-se a alumina numa mufla a 200 °C durante 24 horas.

Para remover os tocoferóis passou-se então o óleo de peixe pela coluna cromatográfica com a alumina ativada e realizou-se a eluição sob pressão de azoto recolhendo-se o óleo num matraz.

### **3.3. Determinação da constante de partição binária, $P_A^O$ , dos antioxidantes numa mistura binária óleo de peixe/água**

Para a determinação dos valores de  $P_A^O$  para os diversos compostos, preparou-se uma mistura binária 4:6 (O/A) de óleo de peixe purificado e solução aquosa (Tampão citrato 0,04 M e pH = 3,65) num volume total de 10 mL. Dissolveu-se cada antioxidante estudado numa das fases (os hidrofílicos na fase aquosa e os hidrofóbicos na fase oleosa) obtendo-se uma concentração final do antioxidante de  $3,0 \times 10^{-3}$  M no volume total da mistura binária. Termostatizou-se a mistura durante 15 minutos e de seguida agitou-se com um homogeneizador *Polytron PT 1600 E* a uma velocidade de 20 000 r.p.m. durante 1 minuto. Transferiu-se cada mistura para um tubo de centrifuga e procedeu-se à separação das fases por centrifugação durante 45 minutos.

Além das misturas binárias com antioxidante preparou-se também, para cada composto estudado, uma mistura binária controlo (sem antioxidante) 4:6 (V/V) (óleo de peixe/solução tampão citrato 0,04 M e pH = 3,65), e procedeu-se do mesmo modo.

Diluiu-se uma alíquota (normalmente 100 µL) da fase aquosa em solução aquosa tampão citrato 0,04 M e pH = 3,65 e leu-se a absorvância da fase aquosa a um comprimento de onda de 269 nm. Este comprimento de onda foi retirado do espectro UV do ácido gálico, Figura 14, que representa o comprimento de onda de máxima absorvância do AO nesta zona.

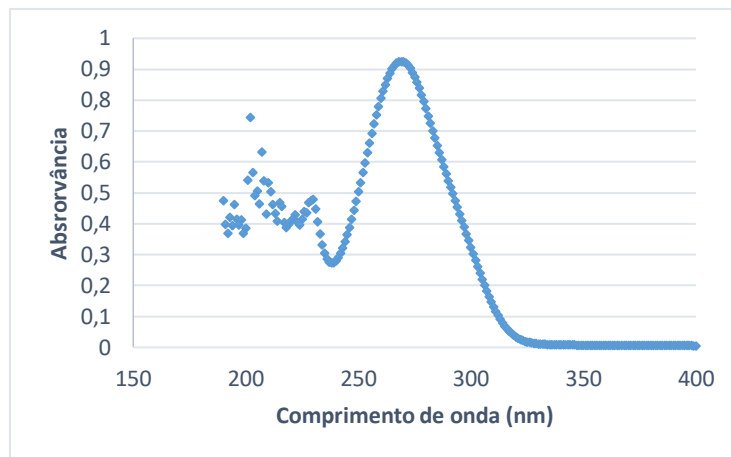


Figura 14. Espectro de absorção UV do ácido gálico.

Com o objetivo de quantificar o antioxidante presente na fase aquosa (em tampão citrato, pH = 3,65), prepararam-se curvas de calibração absorvância-concentração, para cada um dos antioxidantes.

Determinou-se a percentagem de AO no óleo através da expressão  $100\%AO_A$  uma vez que o óleo de peixe, ao comprimento de onda estudado para os AOs (269 nm), apresenta elevada absorvância (Figura 15), impossibilitando a sua determinação.

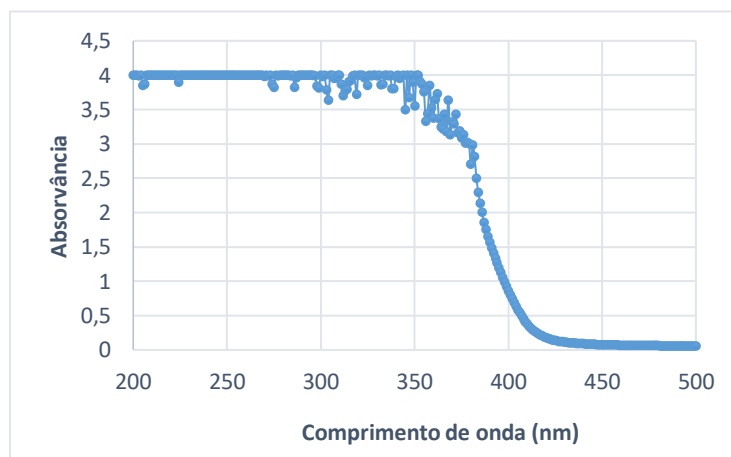


Figura 15. Espectro de absorção UV do óleo de peixe.

Realizou-se então a determinação da constante de partição binária,  $P_A^o$ , para todos os antioxidantes estudados utilizando a Equação 54.

$$P_A^o = \frac{\%AO_o \cdot V_A}{\%AO_A \cdot V_o} \quad (54)$$

Realizaram-se os ensaios em triplicado. No esquema a seguir apresentado (Figura 16), encontra-se resumido o procedimento da determinação desta constante de partição.

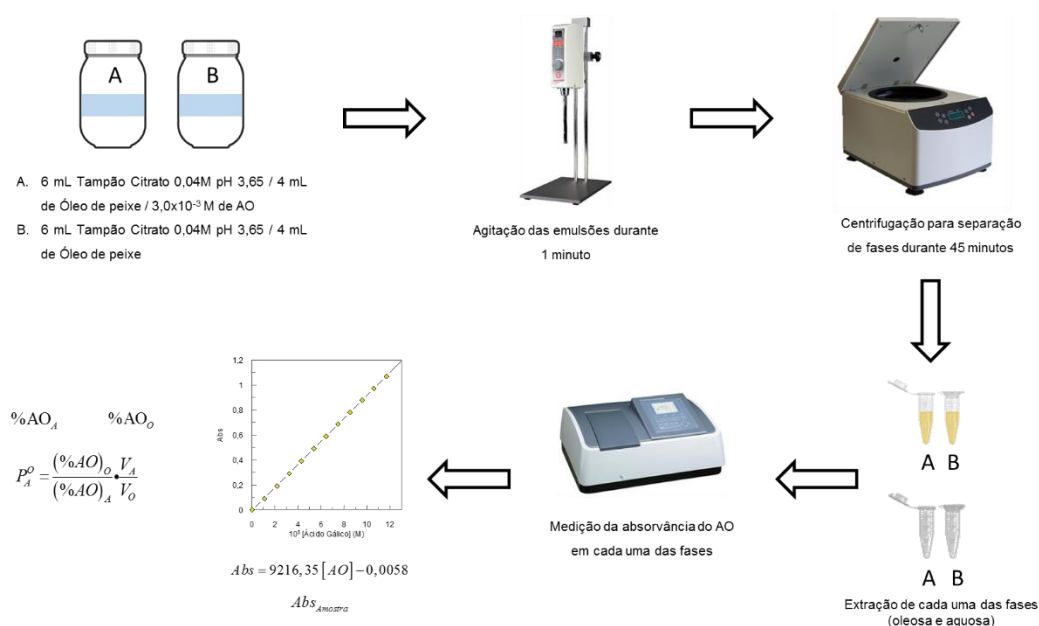


Figura 16. Esquema do procedimento experimental seguido para a determinação da constante de partição binária.

### 3.4. Método cinético para a determinação das constantes de partição em emulsões modelo

#### 3.4.1. Preparação de reagentes e soluções

### 3.4.1.1. Preparação da solução de dicloridrato de N-(Naft-1-il)etilenodiamina (NED.2HCl)

Preparou-se a solução do agente copulante dissolvendo-se 4,92 g de dicloridrato de N-(Naft-1-il)etilenodiamina (NED.2HCl) em 500 mL de etanol, recorrendo a aquecimento para a total dissolução do sólido no solvente. Perfez-se o volume, posteriormente, com butanol obtendo-se um volume total de mistura de 1 L, com uma concentração de 0,0190 M. Armazenou-se a solução num recipiente de plástico protegido com papel de alumínio para minimizar a presença de luz e uma possível fotodecomposição.

### 3.4.1.2. Preparação da solução tampão ácido cítrico-citrato

Preparou-se a solução tampão ácido cítrico/citrato 0,04 M. Para tal foi necessário determinar a quantidade necessária de ácido cítrico a adicionar e de hidróxido de sódio para se obter o pH pretendido para a solução (pH = 3,65). O pH das diversas soluções tampão preparadas verificou-se por potenciometria.

### 3.4.1.3. Síntese do sal de arenodiazónio e preparação de uma solução de $16\text{ArN}_2^+$

A síntese do sal de arenodiazónio realizou-se de acordo com o procedimento descrito por Doyle [35] e a reação encontra-se esquematizada na Figura 17.

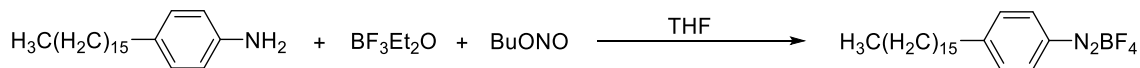


Figura 17. Reação da síntese do sal de arenodiazónio.

Num gobelé, colocaram-se 4,5 mL de eterato de trifluoreto de boro ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ), mantendo-se o gobelé num banho gelo-acetona a  $-15^\circ\text{C}$ . Pesaram-se 2,45 g de 4-hexadecilanilina (0,024 mol) e dissolveram-se num volume mínimo de tetrahydrofurano (THF) e adicionou-se ao volume de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , em agitação contínua. À mistura resultante, em constante agitação, adicionaram-se, gota-a-gota, 3,30 mL de n-butil nitrito ( $\text{BuONO}$ ) (0,029 mol), iniciando-se assim a reação de diazotação.

Após todo o BuONO adicionado, deixou-se reagir durante 20 minutos para assegurar que a reação fosse completa. Decorrido este tempo, dissolveu-se a mistura reacional em acetonitrilo e precipitou-se com éter etílico. Filtrou-se o precipitado por vácuo e realizou-se recristalização mais três vezes.

Obtiveram-se 0,8197 g de um sólido cristalino branco (rendimento de 32%), armazenado a -20 °C para assegurar as condições adequadas de luminosidade e temperatura a fim de minimizar a sua decomposição.

Preparou-se a solução do sal tetrafluorburato de 4-hexadecilbenzenodiazónio. Para isso pesou-se a quantidade adequada de composto para um eppendorf onde se adicionou 1 mL de acetonitrilo obtendo-se uma solução de concentração 0,17 M. Armazenaram-se todas as soluções do sal a -20 °C e na ausência de luz.

### 3.4.2. Preparação de emulsões

Nos frascos onde se prepararam as emulsões pesaram-se diretamente  $3,0 \times 10^{-5}$  moles de antioxidante. Prepararam-se 10 mL de emulsão misturando óleo de peixe purificado com tampão citrato 0,04 M e pH = 3,65 numa proporção de 4:6 (v/v, O/A) com diferentes frações de emulsionante Tween 80 ( $\Phi=0,005 - 0,042$ ). Agitou-se a mistura com um homogeneizador *Polytron PT 1600 E*, durante 1 minuto, a uma velocidade de 20 000 r.p.m. obtendo-se uma mistura homogénea opaca e com aspeto leitoso.

### 3.4.3. Determinação das constantes de velocidade $k_{obs}$ das emulsões

Preparada a emulsão e colocada na célula termostatzada a 25 °C procedeu-se à determinação da constante de velocidade,  $k_{obs}$ . Depois de atingida a temperatura ideal de trabalho ( $\approx 25,0$  °C) e com agitação contínua adicionou-se uma alíquota de 16  $\mu\text{L}$  de 16-ArN<sub>2</sub><sup>+</sup> 0,176 M à emulsão. No momento em que esta alíquota é adicionada inicia-se a reação com o antioxidante nela presente. Retirou-se uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  a diferentes tempos de reação e adicionou-se a um dos tubos de ensaio para os quais anteriormente tinham sido medidos 2,5 mL de solução de NED.2HCl. Todo o 16-ArN<sub>2</sub><sup>+</sup> que não reagiu com o antioxidante vai reagir com esta solução de NED.2HCl (Figura 18), observando-se a formação do corante azóico (cor púrpura).

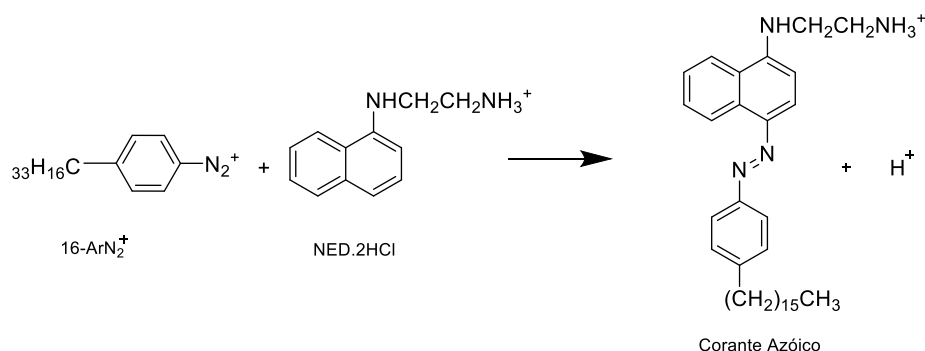


Figura 18. Reação do agente copulante dicloridrato de N-(Naft-1-il)etilenodiamina (NED.2HCl) com os iões 16-ArN<sub>2</sub><sup>+</sup>.

A formação do corante permitiu a medição da absorvância da solução dos tubos, para os diferentes tempos da reação, a um comprimento de onda de 572 nm. Ajustando os dados absorvância-tempo à Equação 55 obteve-se o valor do  $k_{obs}$  para a reação dos iões arenodiazónio,

$$\ln \frac{A_t - A_\infty}{A_0 - A_\infty} = -k_{obs} t \quad (55)$$

na qual,  $A_t$ ,  $A_0$  e  $A_\infty$  representam a absorvância a um tempo  $t$ , a absorvância inicial e a absorvância a um tempo infinito, respetivamente, e  $k_{obs}$  a constante de velocidade observada.

### 3.5. Determinação da atividade antiradicalar – Método do DPPH

O método do DPPH<sup>•</sup> é um método colorimétrico simples. Quando uma solução de DPPH<sup>•</sup> é misturada com uma substância que se comporta como dadora de hidrogénios, o radical livre passa à sua forma reduzida com a perda da sua cor púrpura (passando a apresentar uma cor amarelada) [36].

A atividade antiradicalar é definida pelo parâmetro EC<sub>50</sub> que representa a concentração de antioxidante que é necessária para a redução de 50% da atividade dos radicais DPPH e consequente perda da coloração púrpura [36]. A determinação do EC<sub>50</sub> realizou-se para o ácido gálico e os seus derivados por medição espectrofotométrica do

radical DPPH a 515 nm utilizando-se soluções metanólicas homogêneas com diversas concentrações de antioxidante a uma temperatura de 25 °C.

Numa placa BD Falcon de 96 poços (8 x 12) de poliestireno colocaram-se, em cada poço, 250 µL da solução metanólica de DPPH ( $9,6 \times 10^{-5}$  M) e adicionaram-se 50 µL de uma solução metanólica de cada antioxidante (concentração de 0,050-0,164 mol AO/ mol DPPH').

Mediu-se a absorvância a 515 nm, durante 60 minutos, com leituras intervaladas de 5 minutos. Realizaram-se todos os ensaios em quadruplicado.

Da variação da absorvância observada ao longo do tempo para o desaparecimento do radical DPPH, na presença de distintas concentrações de AO, determinou-se a percentagem de DPPH' que não reagiu com o AO mediante a Equação 56,

$$\% DPPH = \left( \frac{c_f}{c_0} \right) \cdot 100 \quad (56)$$

onde  $c_0$  e  $c_f$  são a concentração inicial e a concentração correspondente ao tempo de medida selecionado a  $\lambda=515$  nm. Para cada tempo da reação, determinou-se o valor de  $EC_{50}$  representando-se a percentagem de DPPH' em função da concentração de AO expressa em mol AO/mol DPPH'. Ajustou-se, a estas variações, uma linha de tendência linear onde a ordenada na origem representa a percentagem de DPPH' na ausência de AO (100%). A partir da equação da reta de ajuste determinou-se o valor de  $EC_{50}$  que corresponde à relação mol AO/ mol DPPH' para uma percentagem de DPPH' de 50% da inicial (ausência de AO).

### 3.6. Avaliação da atividade antioxidante em emulsões – Teste de estufa de Schaal

Para se determinar a atividade antioxidante dos compostos numa emulsão recorreu-se a um teste de aceleração oxidativa designado teste de estufa de Schaal no qual as emulsões preparadas foram mantidas numa estufa a uma temperatura moderada de 40 °C.



Prepararam-se emulsões 4:6 (v/v) com óleo de peixe/tampão citrato (0,04M e pH = 3,65) contendo 1% de emulsionante Tween 80. Prepararam-se as emulsões em triplicado em frascos previamente tratados com NaOH saturado e HCl 37% para evitar a contaminação com gorduras e metais, respetivamente. Adicionaram-se 100 µL de uma solução metanólica 0,05 M de cada antioxidante à fase oleosa de cada frasco exceto aos frascos do controlo, deixando-se evaporar o solvente na estufa a 40 °C.

Preparadas todas as emulsões agitaram-se durante 1 minuto com um homogeneizador *Polytron PT 1600 E*, a uma velocidade de 25.000 r.p.m. Colocaram-se, de seguida, as amostras na estufa sendo estas agitadas diariamente. De cada amostra retiraram-se alíquotas de 12,5 µL para analisar o conteúdo em dienos conjugados por espectrofotometria.

Efetuuou-se um novo teste para os compostos GA, EG, BG, OG e LG com emulsões preparadas segundo o procedimento anterior, mas contendo diferentes percentagens de Tween 80 (0,5%, 1% e 2%) de modo a estudar o efeito do aumento da fração de emulsionante na atividade antioxidante dos compostos.

### 3.6.1. Determinação de dienos conjugados

Mediu-se a absorvância a 233 nm e calculou-se o conteúdo de dienos conjugados (%CD), usando a massa molecular relativa e a absortividade molar do ácido linoleico (280 g/mol,  $\epsilon=26000$ ), segundo a Equação 57, na qual,  $Abs_{233nm}$  representa a absorvância da solução e  $C_{\text{óleo}}$  a concentração de óleo na solução em g/L.

$$\%CD = 1,0769 \frac{Abs_{233nm}}{c_{\text{óleo}} (g / L)} \quad (57)$$

## 3.7. Análise estatística

Os resultados obtidos neste trabalho foram analisados estatisticamente por ANOVA (Analysis of Variance) para um nível de significância  $p \leq 0,05$  usando os testes de Duncan e de Tukey e recorrendo à versão 21 do software IBM® SPSS® Statistics.



# Capítulo 4 – Resultados e Discussão

## 4.1. Composição do óleo de peixe

Como foi referido no capítulo anterior (Capítulo 3, seção 3.1) foi realizado um estudo para determinar a composição do óleo de peixe utilizado ao longo do estudo desta dissertação. No cromatograma, Figura 19, encontram-se os picos correspondentes aos ésteres metílicos dos ácidos gordos presentes no óleo de peixe.

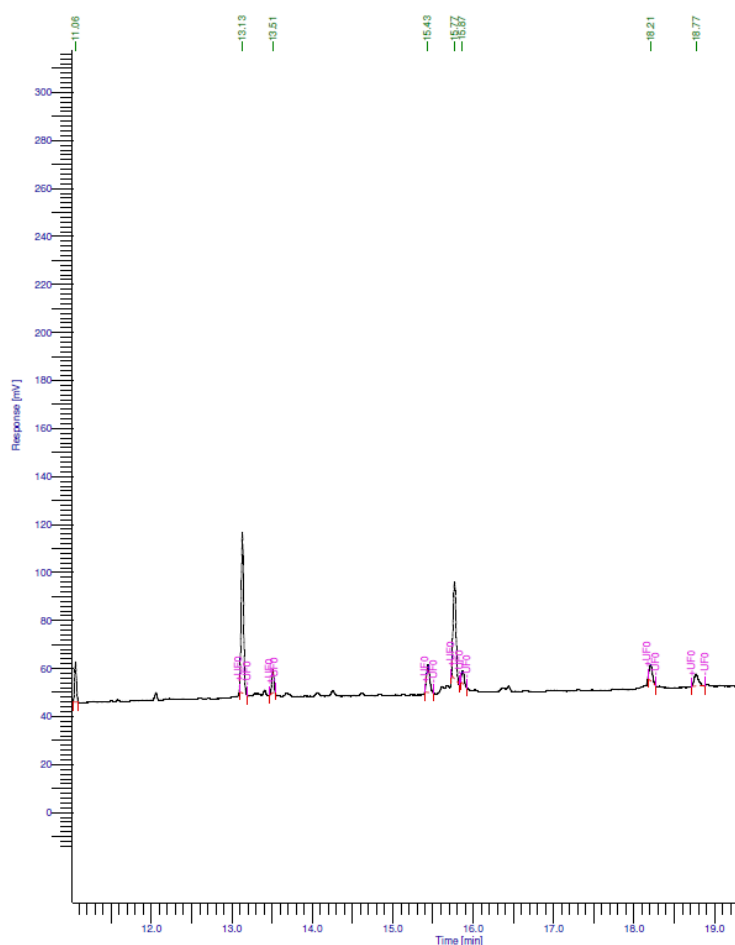


Figura 19. Cromatograma do óleo de peixe utilizado para os estudos da determinação da atividade antioxidante do ácido gálico e dos seus derivados.

Na Tabela 2, encontram-se os ácidos gordos mais presentes no óleo de peixe estudado e as relativas percentagens.

Tabela 2. Valores dos tempos de retenção (min) e a quantidade (%) dos ácidos gordos que constituem o óleo de peixe utilizado para os vários estudos.

Ácido gordo	Tempo retenção (min)	Quantidade (%)
Ácido palmítico (16:0)	13,587	5,3
Ácido palmitoleico (16:1)	13,967	1,3
Ácido esteárico (18:0)	15,911	1,4
Ácido oleico (18:1)	16,296	7,4
Ácido linoleico (18:2)	16,943	0,3
EPA	18,713	2,6
DHA	23,908	20,1

## 4.2. Avaliação da atividade antiradicalar

Para ser possível correlacionar a distribuição do ácido gálico e dos seus derivados com a atividade antioxidante, realizaram-se experiências para determinar em primeiro lugar a capacidade antiradicalar destes, de modo a verificar que a sua reatividade não era alterada pela introdução de cadeias de tamanhos distintos na molécula e, posteriormente estudar a eficácia antioxidante em emulsões modelo contendo como fase oleosa óleo de peixe.

### 4.2.1. Método do DPPH•

Este é um método colorimétrico simples que se baseia na diminuição da absorvância do radical DPPH (que apresenta uma cor púrpura) a 515 nm, devido à ocorrência da reação deste com o antioxidante. Na Figura 20, está representada a

variação da absorvância do radical de DPPH há media que ele reage com o galato de butilo ao longo do tempo, em segundos.

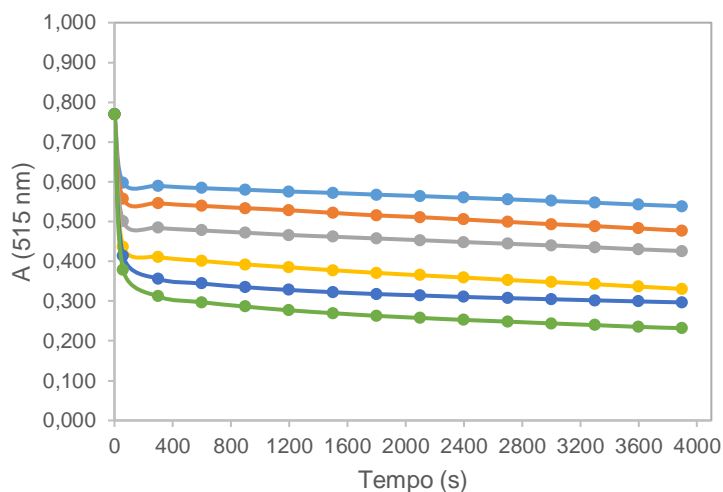


Figura 20. Variação da absorvância do radical DPPH\* ( $\lambda=515$  nm) na presença de diferentes concentrações de galato de butilo -●- 0,051 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,068 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,085 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,10 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,12 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,14 mol de AO/mol DPPH\*,  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

A atividade antiradicalar define-se a partir do parâmetro  $\text{EC}_{50}$ , que representa a concentração mínima necessária para o antioxidante captar 50% dos radicais de DPPH iniciais.

Para determinar este parâmetro representou-se graficamente para um determinado tempo, a variação da percentagem de DPPH\* em função da relação mol AO/mol DPPH\*, representado na Figura 21.

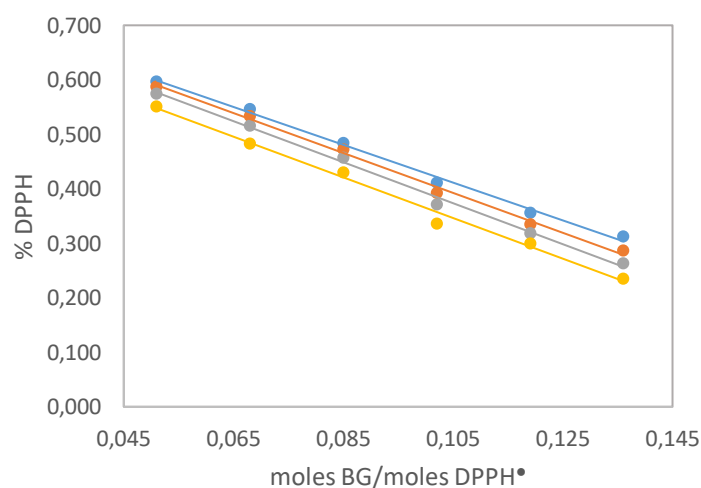


Figura 21. Representação da variação da percentagem de DPPH\* com a concentração de galato de butilo, expressa em mol AO/mol DPPH\*, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear.

-●- 5 minutos, -●- 15 minutos, -●- 30 minutos, -●- 60 minutos

Os valores de  $EC_{50}$  obtidos para o ácido gálico e para os seus derivados encontram-se na Tabela 3.

Uma vez que estes valores indicam a relação mol AO/mol DPPH• necessária para reduzir a concentração de radicais DPPH para metade, aqueles antioxidantes que apresentam um valor de  $EC_{50}$  menor, são os que apresentam uma maior atividade antiradicalar.

**Tabela 3.** Valores de  $EC_{50}$  obtidos para diferentes tempos de reação para o ácido gálico e seus derivados.

t / minutos	5	15	30	60
Antioxidante	$EC_{50} \pm \sigma$	$EC_{50} \pm \sigma$	$EC_{50} \pm \sigma$	$EC_{50} \pm \sigma$
<b>GA</b>	0,1024±0,0025	0,0946±0,0026	0,0923±0,0019	0,0911±0,0021
<b>MG</b>	0,1078±0,0017	0,1022±0,0011	0,0994±0,0010	0,0982±0,0014
<b>EG</b>	0,1175±0,0045	0,1128±0,0139	0,1110±0,0019	0,1086±0,0015
<b>PG</b>	0,1117±0,0031	0,1069±0,0024	0,1037±0,0019	0,1101±0,0009
<b>BG</b>	0,1122±0,0056	0,1073±0,0027	0,1038±0,0013	0,1002±0,0015
<b>OG</b>	0,1009±0,0046	0,0930±0,0006	0,0908±0,0007	0,0893±0,0007
<b>DG</b>	0,0933±0,0001	0,0896±0,0008	0,0879±0,0004	0,0870±0,0004

$EC_{50}$  expresso em mol de antioxidante/ mol de DPPH•

Com os resultados obtidos verifica-se que, em solução metanólica, não se verificam diferenças estatisticamente significativas no valor de  $EC_{50}$  para o ácido gálico e os seus derivados uma vez que a estrutura fenólica é comum a todos eles. Esta conclusão é permitida pela aplicação do teste de Tukey cuja análise estatística se apresenta na subsecção 5.1 dos anexos.

## 4.3. Distribuição do ácido gálico e dos seus derivados em sistemas binários óleo de peixe/água

### 4.3.1. Determinação da constante de partição $P_A^O$

Determinou-se a constante de partição,  $P_A^O$ , do ácido gálico e dos seus derivados para uma mistura binária constituída por 4 mL de óleo de peixe purificado e 6 mL de

solução tampão citrato 0,04 M e pH = 3,65, contendo uma concentração de  $3,0 \times 10^{-3}$  M do antioxidante, de acordo com o procedimento descrito na secção anterior.

Para tal, quantificaram-se espectralmente os vários antioxidantes na fase aquosa, e calculou-se o valor da constante de partição utilizando a Equação 58.

$$P_A^O = \frac{P_A^I}{P_O^I} = \frac{(AO)_O}{(AO)_A} = \frac{\% AO_O}{\% AO_A} \cdot \frac{V_A}{V_O} \quad (58)$$

Na Tabela 4, encontram-se os resultados obtidos para a distribuição dos diferentes antioxidantes nas misturas binárias.

**Tabela 4.** Percentagem dos diferentes antioxidantes na fase aquosa e oleosa de uma mistura binária óleo de peixe/água e os valores das constantes de partição.

Mistura binária 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato)		GA	MG	PG	BG	OG	LG
	% (AO) <sub>O</sub>	3,5 <sup>a</sup>	9,4 <sup>a</sup>	34,5 <sup>a</sup>	59,6 <sup>a</sup>	~100 <sup>a</sup>	~100 <sup>a</sup>
	% (AO) <sub>A</sub>	96,5±2,1	90,6 <sup>b</sup>	65,5±0,2	40,4±1,1	~0	~0
	$P_A^O$	0,05±0,03	0,156±0,001	0,792±0,002	2,21±0,10	>> 2,21	>> 2,21

a - valores determinados teoricamente como  $\%AO_O = 100 - \%AO_A$

b – valor determinado apenas com uma amostra

Para o galato de octilo (OG) e para o galato de dodecilo (LG) não foi possível a determinação da constante de partição  $P_A^O$  uma vez que a absorvância do óleo é muito superior à banda de absorção do antioxidante e, portanto, esta última é mascarada. Através da medição espectral da região aquosa das misturas contendo estes AOs pôde-se concluir que os antioxidantes se encontram cerca dos 100% na região oleosa.

Como se esperava, a solubilidade do ácido gálico é bastante alta na fase aquosa tendendo a decrescer já para o galato de metilo. Pelos valores presentes na Tabela 4 verifica-se que, quanto menor for a cadeia carbonada (GA e MG) maior a afinidade do AO para a fase aquosa e maior a percentagem de AO nesta mesma região. Já para os antioxidantes que apresentam uma cadeia carbonada maior, ou seja, os que são mais lipofílicos, apresentam uma maior afinidade para a região oleosa e encontram-se em maior percentagem nesta mesma região.

No caso dos antioxidantes com uma cadeia carbonada intermédia, como é o caso do galato de propilo e galato de butilo, verifica-se uma distribuição do antioxidante por ambas as fases.

O valor de  $P_A^O$  aumenta quatro vezes com o aumento da hidrofobicidade do composto passando de um  $P_A^O = 0,05$  (GA) para  $P_A^O = 2,21$  (BG). O valor encontrado para o PG ( $P_A^O = 0,792$ ) em emulsões contendo óleo de peixe foi semelhante ao encontrado em misturas contendo azeite e óleo de milho,  $P_A^O = 0,73$  e  $P_A^O = 0,83$ , respetivamente [37]. A natureza da fase oleosa parece não afetar o valor da constante de partição binária  $P_A^O$ .

Os resultados obtidos sugerem que em emulsões o GA e o MG se devem distribuir entre a fase aquosa e a interface, o PG e o BG entre as três regiões e o OG e o LG entre a região oleosa e a interface. Portanto, os antioxidantes selecionados constituem uma série de compostos com o mesmo grupo reativo mas com uma hidrofobicidade distinta. Tal permite avaliar o efeito da hidrofobicidade do AO na distribuição e perceber em que extensão isto afeta a sua eficácia antioxidante.

## 4.4. Distribuição do ácido gálico e dos seus derivados em emulsões óleo de peixe/água

### 4.4.1. Distribuição do ácido gálico e do galato de metilo em emulsões óleo de peixe/tampão citrato (O/A)

#### 4.4.1.1. Determinação do $k_{obs}$ mediante o método da derivatização e cálculo da constante de partição, $P_A^I$

Nesta determinação, e recorrendo ao método de derivatização, estudou-se o efeito que a fração de emulsionante, utilizada em cada uma das emulsões, apresenta no valor da constante de velocidade observada ( $k_{obs}$ ) para a reação entre o catião de arenodiazónio e o ácido gálico (GA) e o galato de metilo (MG), em emulsões 4:6 (v/v, O/A). Para isso, foram utilizadas frações de emulsionante que variaram entre  $\Phi = 0,005$



e  $\Phi = 0,042$ . Observou-se que nestas experiências os pares de dados absorvância-tempo, se ajustaram a uma equação integrada de primeira ordem (Equação 38, secção 3.3.3), sendo possível a partir dela, obter o valor de  $k_{obs}$ . Nas Figuras 22 e 23 encontram-se apresentadas a variação típica da absorvância do corante em função do tempo, bem como a representação de  $\ln(A_t - A_\infty)$  em função do tempo, para o GA e para o MG, respetivamente.

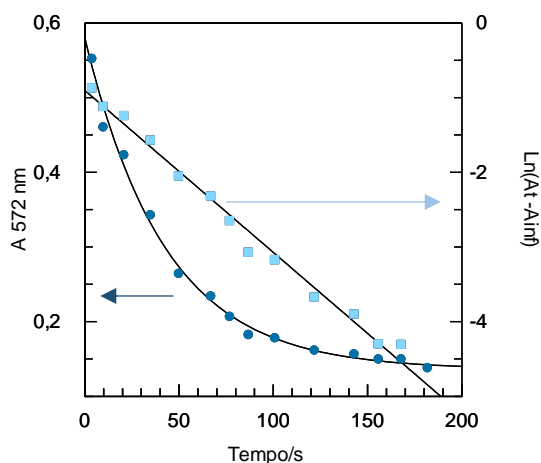


Figura 22. Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln[A_t - A_\infty]$  vs tempo para o GA. Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80),  $\Phi = 0,005$ ,  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,86 \times 10^{-4}$  M,  $[AO] = 2,98 \times 10^{-3}$  M,  $[NED] = 0,019$  M,  $T = 25,7$  °C.

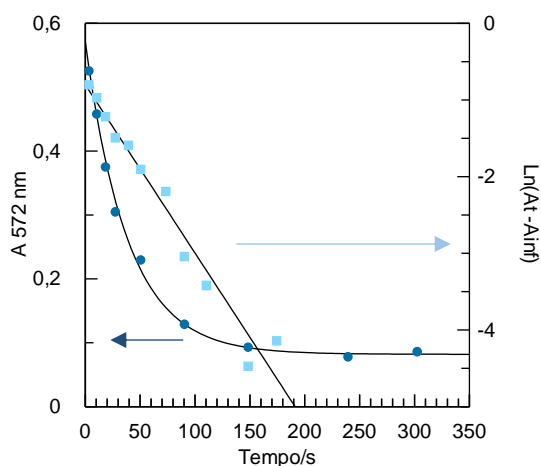


Figura 23. Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln[A_t - A_\infty]$  vs tempo para o MG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80),  $\Phi = 0,005$ ,  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,83 \times 10^{-4}$  M,  $[AO] = 3,05 \times 10^{-3}$  M,  $[NED] = 0,019$  M,  $T = 25,7$  °C.

Uma vez que o ácido gálico e o galato de metilo apresentam uma elevada solubilidade na fase aquosa e se distribuem muito perto de 100% nesta região da emulsão, analisaram-se os resultados com base no modelo simplificado da pseudofase. A representação esquemática da região interfacial de uma emulsão com base no

modelo cinético da pseudofase mostrando a partição do AO entre as regiões interfacial e aquosa é ilustrada na Figura 13 do ponto 1.4.2.2 do capítulo 1.

Nas Figuras 24 e 25, encontra-se representada a variação de  $k_{obs}$  em função de  $\Phi_I$  para ambos os AOs.

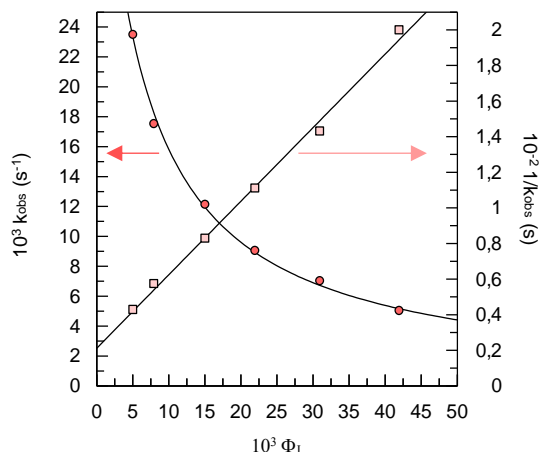


Figura 24. Representação de  $k_{obs}$  e  $1/k_{obs}$  vs fração de emulsionante ( $\Phi_I$ ) com os respectivos ajustes às Equações 49 e 50, para o GA. Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80),  $[16-ArN_2^+] = 2,86 \times 10^{-4} M$ ,  $[AO] = 2,98 \times 10^{-3} M$ ,  $[NED] = 0,019 M$ ,  $T = 25,7^\circ C$ .

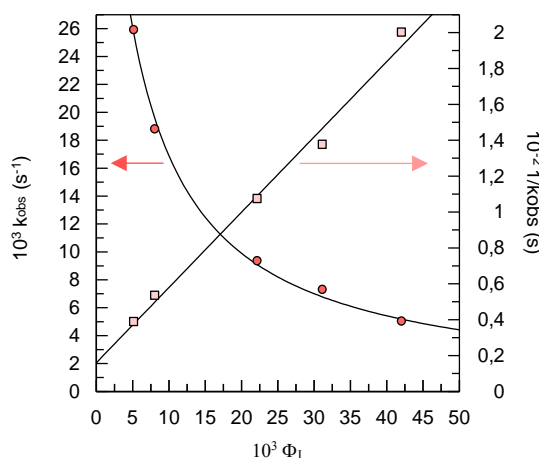


Figura 25. Representação de  $k_{obs}$  e  $1/k_{obs}$  vs fração de emulsionante ( $\Phi_I$ ) com os respectivos ajustes às Equações 49 e 50, para o MG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80),  $[16-ArN_2^+] = 2,83 \times 10^{-4} M$ ,  $[AO] = 3,05 \times 10^{-3} M$ ,  $[NED] = 0,019 M$ ,  $T = 25,7^\circ C$ .

Observando as Figuras 24 e 25, verifica-se que ocorre uma diminuição do valor de  $k_{obs}$  à medida que o valor de  $\Phi_I$  aumenta. Esta relação era esperada pela aplicação do cálculo do valor de  $k_{obs}$  pela Equação 49.

Da representação linear de  $1/k_{obs}$  vs  $\Phi_I$  podem-se obter os parâmetros  $a$  e  $b$  através do ajuste à Equação 50 (Secção 1.4.2.2) a partir dos valores do declive e da ordenada na origem, onde  $a = k_I [AO_I]$  e  $b = P_A^I / \Phi_A$ .

Tabela 5. Valores dos parâmetros  $a$  e  $b$  obtidos a partir do ajuste dos dados das Figuras 24 e 25 à Equação 50.

Composto	Parâmetro	Emulsão 4:6 (v/v, O/A)
GA	$10^2 a$	$0,025 \pm 0,010$
	$b$	$182 \pm 17$
MG	$10^2 a$	$0,024 \pm 0,002$
	$b$	$239 \pm 39$

Utilizando os valores de  $a$  e  $b$ , calcularam-se os valores de  $k_I$  e  $P_A^I$ , para o GA e o MG presentes na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de  $P_A^I$  e  $k_I$  obtidos para a emulsão 4:6 (O/A) a partir do ajuste dos dados das Figura 24 e 25 à Equação 50.

Composto	Emulsão 4:6 (v/v, O/A)	
GA	$P_A^I$	$118 \pm 19$
	$k_I (M^{-1} s^{-1})$	$0,082 \pm 0,003$
MG	$P_A^I$	$158 \pm 60$
	$k_I (M^{-1} s^{-1})$	$0,078 \pm 0,005$

Verifica-se que a percentagem de galato de metilo (MG) na região interfacial é ligeiramente superior à de ácido gálico (GA). Esta constatação resulta da obtenção de uma constante de partição ( $P_A^I = 157,5$ ) cujo valor é mais elevado do que o obtido para o ácido gálico ( $P_A^I = 117,6$ ) sugerindo que a percentagem de MG na região aquosa é menor do que a de GA. Comparando este valor com os valores obtidos em estudos já realizados para o ácido gálico (GA) em emulsões preparadas com óleo de milho (GA -  $P_A^I = 131$ ) ou azeite (GA -  $P_A^I = 101$ ) verifica-se que a natureza da região oleosa não interfere significativamente no valor da constante de partição  $P_A^I$  [37].

Os valores de  $k_I$  obtidos para ambos os compostos não são necessários para determinar a distribuição dos AOs. No entanto, são importantes porque proporcionam pistas acerca do mecanismo de reação permitindo determinar parâmetros de energia termodinâmicos para a transferência dos AOs da região aquosa para a região interfacial [29].

Verificou-se que o valor de  $k_I$  obtido para o ácido gálico é também semelhante ao obtido em estudos anteriores [37].

#### 4.4.1.2. Análise da distribuição do ácido gálico e do galato de metilo

Aplicando as Equações 52 e 53 (Secção 1.4.2.2) do modelo cinético da pseudofase simplificado (MCPS) e obtidos os valores de  $P_A^I$ , pode obter-se a percentagem de ácido gálico (GA) e de galato de metilo (MG) na região aquosa e na interface, para cada um dos valores de fração de emulsionante ( $\Phi_I$ ), Figura 26.

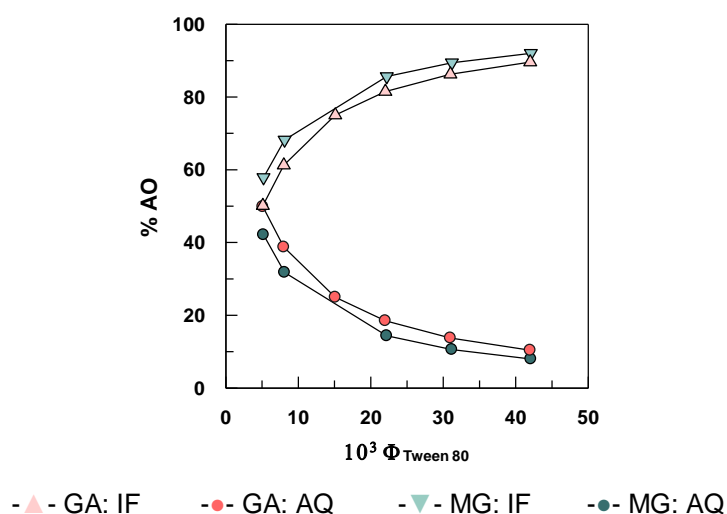


Figura 26. Variação da percentagem de GA e MG nas fases aquosa (AQ) e interfacial (IF) do sistema emulsionado.

O ácido gálico (GA) e o seu derivado, galato de metilo (MG), apresentam um comportamento idêntico no que diz respeito à sua distribuição nas regiões aquosa e interfacial da emulsão.

Pela análise da Figura 26, verifica-se que para a fração de emulsionante menor,  $\Phi_I = 0,005$ , a percentagem de ácido gálico que se encontra na região interfacial é aproximadamente 50%, aumentando para cerca de 90% à medida que se aumenta a fração de emulsionante até  $\Phi_I = 0,042$ . A percentagem de galato de metilo que se encontra na região interfacial é de aproximadamente 58% e, aumentando a fração de emulsionante, a percentagem deste derivado na interface aumenta para cerca de 92% diminuindo por isso a diferença na percentagem dos AOs presentes na interface à medida que se aumenta o volume de emulsionante.

A partir da determinação da constante de partição binária destes dois antioxidantes, esperava-se que o galato de metilo se distribuisse em maior percentagem na região interfacial do que o ácido gálico o que pode ser comprovado pela análise da Figura 26.

#### 4.4.2. Distribuição do galato de propilo e do galato de butilo em emulsões óleo de peixe/tampão citrato (O/A)

##### 4.4.2.1. Determinação do $k_{obs}$ mediante o método da derivatização e cálculo das constantes de partição, $P_A^I$ e $P_O^I$

Estudou-se, como para os compostos referidos anteriormente e recorrendo ao método da derivatização, o efeito que a fração de antioxidante exerce sobre o valor de  $k_{obs}$  da reação entre o sal de arenodiazónio e o galato de propilo (PG) e o galato de butilo (BG), em emulsões 4:6 óleo de peixe/tampão citrato (0,04 M, pH = 3,65, T = 25 °C) para frações de emulsionante (Tween 80), compreendidas entre 0,005 e 0,042. Observou-se que, nestas experiências, os pares de dados absorvância-tempo se ajustaram a uma equação integrada de primeira ordem (Equação 55, secção 3.4.3) sendo possível, a partir dela, obter o valor de  $k_{obs}$ . Nas Figuras 27 e 28 encontram-se apresentadas a variação típica da absorvância do corante em função do tempo, bem como a representação de  $\ln(A_t - A_\infty)$  em função do tempo, para o PG e para o BG, respetivamente.

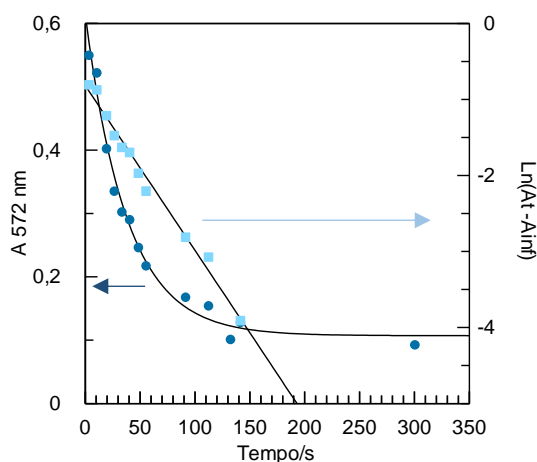


Figura 27. Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln[A_t - A_\infty]$  vs tempo para o PG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80),  $\Phi = 0,015$ ,  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,82 \times 10^{-4}$  M,  $[AO] = 3,05 \times 10^{-3}$  M,  $[NED] = 0,019$  M, T = 25,8 °C.

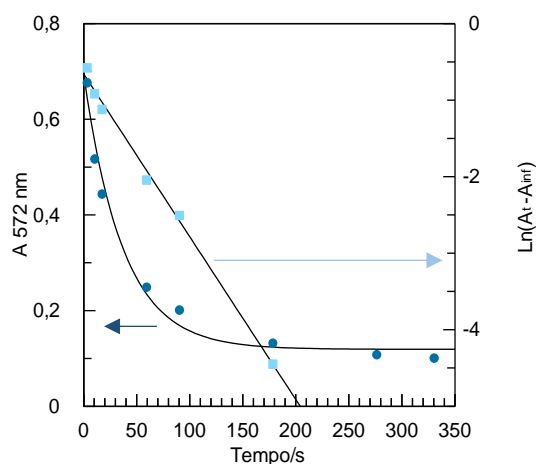


Figura 28. Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln [A_t - A_{\infty}]$  vs tempo para o BG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80),  $\Phi = 0,015$ ,  $[16-ArN_2^+] = 2,83 \times 10^{-4}$  M,  $[AO] = 3,01 \times 10^{-3}$  M,  $[NED] = 0,019$  M,  $T = 25,3$  °C.

Pelos valores de  $P_A^o$  (secção 4.1.1) indicados anteriormente para estes dois derivados, espera-se que o galato de propilo e o galato de butilo se distribuam entre as três regiões da emulsão, regiões aquosa, oleosa e interfacial. Por isso, são necessárias duas constantes de partição para descrever a distribuição destes derivados do ácido gálico,  $P_A^I$  e  $P_O^I$ , utilizando-se, neste caso, o modelo cinético completo da pseudofase (MCP).

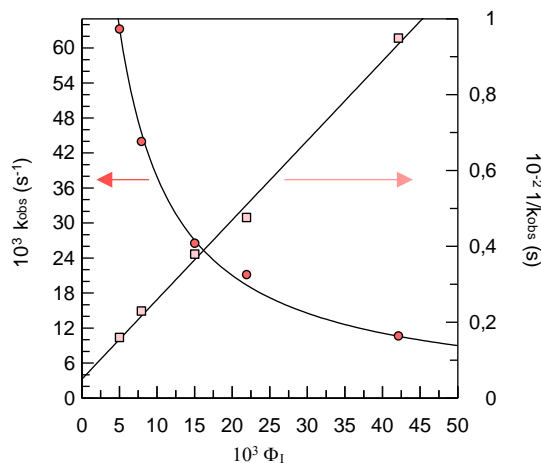


Figura 29. Representação de  $k_{obs}$  e  $1/k_{obs}$  vs fração de emulsionante ( $\Phi_I$ ) com os respectivos ajustes às Equações 30 e 31, para o PG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80),  $[16-ArN_2^+] = 2,82 \times 10^{-4}$  M,  $[AO] = 3,05 \times 10^{-3}$  M,  $[NED] = 0,019$  M,  $T = 25,8$  °C.

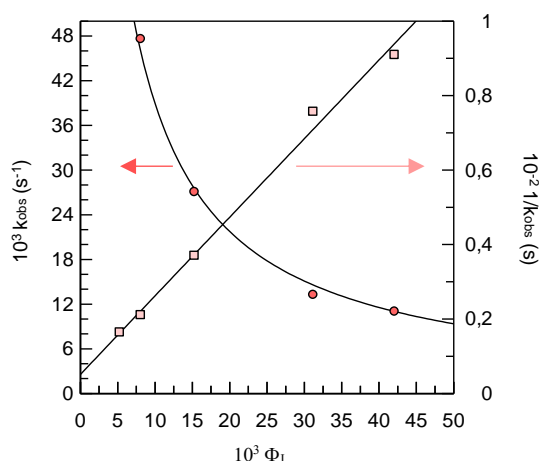


Figura 30. Representação de  $k_{obs}$  e  $1/k_{obs}$  vs fração de emulsionante ( $\Phi_1$ ) com os respetivos ajustes às Equações 30 e 31, para o BG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80),  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,83 \times 10^{-4}$  M,  $[AO] = 3,05 \times 10^{-3}$  M,  $[NED] = 0,019$  M,  $T = 25,2$  °C.

Da representação linear de  $1/k_{obs}$  vs  $\Phi_1$  (Figuras 29 e 30) obtém-se os valores dos parâmetros a e b através do ajuste à Equação 30 e 31 (secção 1.4.2.1) a partir dos valores do declive e da ordenada na origem para ambos os compostos (Tabela 7).

Tabela 7. Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados das Figuras 29 e 30 à Equação 31.

Composto	Parâmetro	Emulsão 4:6 (v/v, O/A)
PG	$10^2 a$	$19,3 \pm 2,9$
	b	$409 \pm 83$
BG	$10^2 a$	$18,6 \pm 2,9$
	b	$376 \pm 81$

Com o valor de  $P_A^O$  e com a variação de  $k_{obs}$  em função da fração de emulsionante ( $\Phi_1$ ) para um sistema emulsionado com uma determinada razão óleo/água, podem ser obtidas as constantes de partição  $P_O^I$  e  $P_A^I$  resolvendo um sistema de duas equações a duas incógnitas.

**Resolução do sistema de duas equações a duas incógnitas,  $P_O^I$  e  $P_A^I$ :**

$$\begin{cases} b = \frac{P_A^I P_O^I (1 + \phi_A / \phi_O)}{P_A^I + \phi_A / \phi_O P_O^I} - 1 \\ P_A^O = \frac{P_A^I}{P_O^I} = 0,156 \end{cases}$$

Os valores de  $P_O^I$  e  $P_A^I$  obtidos para a emulsão 4:6 encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Valores de  $P_A^I$ ,  $P_O^I$ ,  $P_A^O$  e  $k_t$ , obtidos a partir da determinação espectrofotométrica de  $P_A^O$  e de vários ensaios ( $k_{obs}$ ,  $\Phi_i$ ) para emulsões 4:6 (óleo/água), T=25 °C.

Emulsão	Composto	$k_t$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$P_A^I$	$P_O^I$	$P_A^O$
4:6	PG	0,155±0,114	376±13	475±15	0,792±0,008
	BG	0,162±0,019	559±127	253±56	2,21±0,10

Tanto os valores de  $P_A^I$  como os valores de  $P_O^I$  são elevados o que indica a tendência do galato de propilo (PG) e do galato de butilo (BG) se incorporarem na região interfacial das emulsões. Além disso permite afirmar que o processo de transferência destes AOs para a interface é espontâneo ( $\Delta G = -RT \ln P$ ). Verifica-se que o valor de  $P_A^I$  para o PG ( $P_A^I = 375,99$ ) é mais baixo do que para o BG ( $P_A^I = 559,31$ ) o que se explica pelo efeito do aumento da hidrofobicidade do AO. Os valores de  $P_O^I$  diminuem aumentando a hidrofobicidade indicando assim maior solubilidade do BG no óleo, quando comparado com o PG (Equação 19 e 20, Secção 1.4.1).

Obtiveram-se resultados similares para o PG em emulsões preparadas com azeite ( $P_A^I = 327,74$  e  $P_O^I = 449,96$ ) no entanto os valores obtidos para o óleo de peixe aparentam ser o dobro dos obtidos para o óleo de milho [37]. Esta diferença deve-se ao facto de não saber como a natureza do azeite/óleo afeta as constantes de partição e por consequência a distribuição do AO. Os azeites/óleos comparados apresentam composições distintas e além disso o emulsionante utilizado não foi o mesmo. Assim a polaridade dos azeites/óleos comparados é diferente e o próprio azeite pode ter componentes minoritários que atuam como emulsionantes e alteram assim a natureza da interface. Do mesmo modo o valor de  $k_t$  obtido para o PG é também semelhante ao obtido em emulsões de óleo de milho ( $k_t = 0,140$ ) e de azeite ( $k_t = 0,142$ ) [37].

#### 4.4.2.2. Análise da distribuição do galato de propilo e do galato de butilo

Aplicando as Equações 35, 36 e 37 do modelo cinético da pseudofase completo (MCP) e conhecendo os valores de  $P_A^I$  e  $P_O^I$ , obtém-se a percentagem de galato de propilo (PG) e de galato de butilo (BG) nas três regiões da emulsão (aquosa, oleosa e interfacial), para cada um dos valores de fração de emulsionante ( $\Phi_i$ ), Figura 31.



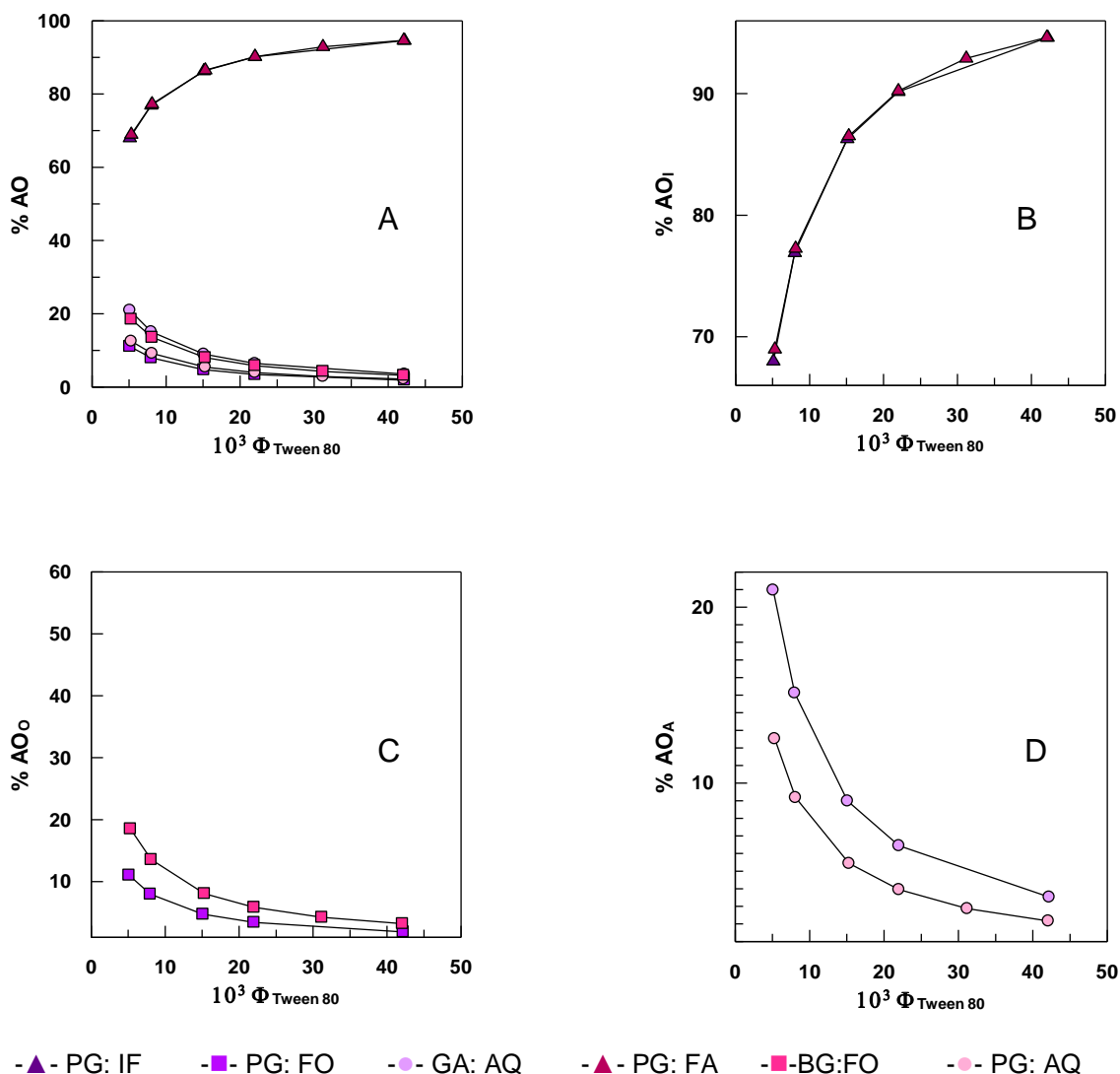


Figura 31. Variação da percentagem de galato de propilo e galato de butilo nas fases aquosa (AQ), interfacial (IF) e oleosa (O) do sistema emulsionado (A), apenas na região interfacial (B), na região oleosa (C) e na região aquosa (D).

Atendendo à distribuição obtida para a fração de emulsionante menor verifica-se que a percentagem de galato de propilo (PG) que se encontra na região interfacial é aproximadamente igual a 68%, aumentando para perto dos 94% conforme se vai aumentando a fração de emulsionante, até se atingir  $\Phi_i = 0,042$ . A percentagem de galato de butilo (BG) que se encontra na região interfacial a  $\Phi_i = 0,005$  é de aproximadamente 69% aumentando para aproximadamente 95% quando a fração de emulsionante é incrementada. Verifica-se uma grande diferença na percentagem de AO na região aquosa e na região oleosa mas percentagens muito semelhantes na interface para qualquer fração de emulsionante. À medida que a concentração de ambos os antioxidantes aumenta na região interfacial (Figura 31 B) nota-se uma diminuição da sua concentração nas regiões oleosa (Figura 31 C) e aquosa (Figura 31 D).

### 4.4.3. Distribuição do galato de octilo e do galato de dodecilo em emulsões óleo de peixe/tampão citrato (O/A)

#### 4.4.3.1. Determinação do $k_{obs}$ mediante o método da derivatização e cálculo da constante de partição, $P_o^I$

Mais uma vez, recorrendo ao método da derivatização estudou-se o efeito exercido pela fração de emulsionante sobre o valor de  $k_{obs}$  da reação entre o sal de arenodiazónio e os galatos de octilo (OG) e dodecilo (LG), em emulsões 4:6 óleo de peixe/tampão citrato (0,04 M, pH = 3,65, T = 25 °C) para frações de emulsionante (Tween 80) compreendidas entre 0,005 e 0,042. Tal como para os compostos anteriores, observou-se que nestas experiências os pares de dados absorvância-tempo se ajustaram a uma equação integrada de ordem 1 (Equação 55, secção 3.4.3) sendo possível, a partir dela, determinar o valor de  $k_{obs}$ .

Nas Figuras 32 e 33 encontram-se apresentados dois exemplos de uma variação típica da absorvância do corante em função do tempo, bem como a representação de  $\ln(A_t - A_\infty)$  em função do tempo, para o OG e para o LG, respetivamente.

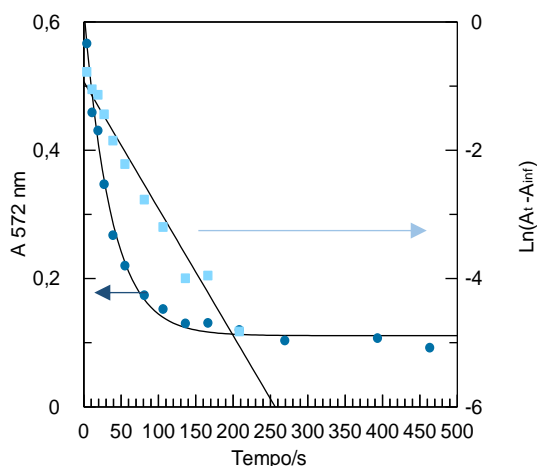


Figura 32. Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln[A_t - A_\infty]$  vs tempo para o OG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80),  $\Phi = 0,015$ ,  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,83 \times 10^{-4}$  M,  $[AO] = 3,05 \times 10^{-3}$  M,  $[NED] = 0,019$  M, T = 25,2 °C.

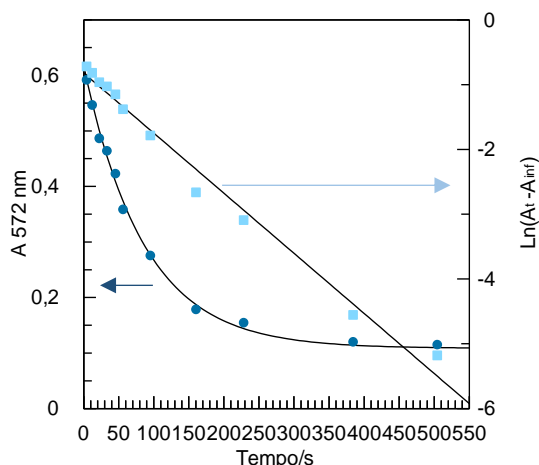


Figura 33. Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln [A_i - A_{\infty}]$  vs tempo para o LG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80),  $\Phi = 0,015$ ,  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,84 \times 10^{-4}$  M,  $[AO] = 3,07 \times 10^{-3}$  M,  $[NED] = 0,019$  M,  $T = 25,3$  °C.

Para ambos os antioxidantes a determinação da constante de partição binária  $P_A^O$  não se realizou uma vez que a absorvância do óleo de peixe é muito superior à banda de absorção do antioxidante sendo esta última mascarada. Através da medição espectrofotométrica da região aquosa pode-se concluir que a percentagem de antioxidante se encontra cerca dos 100% na região oleosa e por isso aplicou-se o Modelo Cinético da Pseudofase Simplificado (MCPS) para analisar os dados experimentais tal como esquematizado na Figura 12 da secção 1.4.2.2.

Nas Figuras 34 e 35 estão representadas as variações de  $k_{obs}$  em função da fração de emulsionante bem como os ajustes exponenciais e lineares às Equações 40 e 44 do modelo cinético da pseudofase simplificado. Através da sua análise pode-se verificar uma diminuição do valor de  $k_{obs}$  à medida que o valor da fração de emulsionante,  $\Phi_i$ , aumenta.

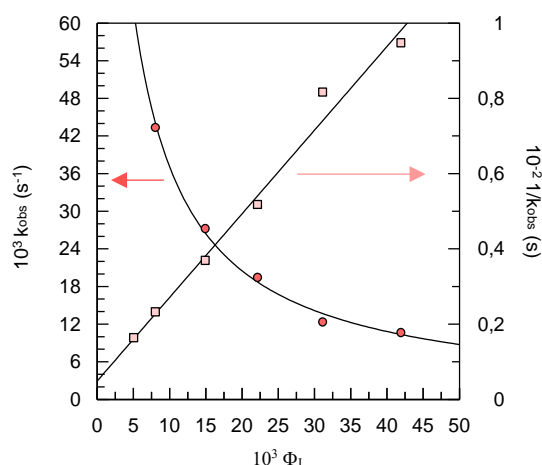


Figura 34. Representação de  $k_{obs}$  e  $1/k_{obs}$  vs fração de emulsionante ( $\Phi_I$ ) com os respectivos ajustes às Equações 40 e 44 para o OG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80),  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,83 \times 10^{-4}$  M,  $[AO] = 3,05 \times 10^{-3}$  M,  $[NED] = 0,019$  M,  $T = 25,2$  °C.

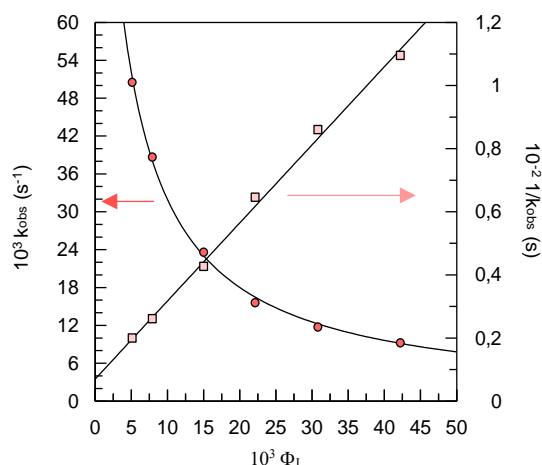


Figura 35. Representação de  $k_{obs}$  e  $1/k_{obs}$  vs fração de emulsionante ( $\Phi_I$ ) com os respectivos ajustes às Equações 40 e 44 para o LG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80),  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,84 \times 10^{-4}$  M,  $[AO] = 3,07 \times 10^{-3}$  M,  $[NED] = 0,019$  M,  $T = 25,3$  °C.

Da representação linear de  $1/k_{obs}$  vs  $\Phi_I$  (Figuras 34 e 35), obtiveram-se os valores dos parâmetros a e b através do ajuste à Equação 44 a partir dos valores do declive e da ordenada na origem para ambos os compostos (Tabela 9).

Tabela 9. Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados das Figuras 34 e 35 à Equação 44.

Composto	Parâmetro	Emulsão (4:6)
OG	$10^2 a$	$0,458 \pm 0,017$
	b	$424 \pm 59$
LG	$10^2 a$	$0,413 \pm 0,015$
	b	$342 \pm 41$

Utilizando o valor de  $a$  e de  $b$  calculou-se o valor de  $k_l$  e de  $P_o'$  para o OG e o LG, apresentando-se esses valores na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de  $P_o'$  e  $k_l$  obtidos a partir do ajuste dos dados à Equação 44.

Composto	Emulsão (4:6)	
OG	$P_o'$	183±126
	$k_l (M^{-1} s^{-1})$	0,148±0,009
LG	$P_o'$	142±37
	$k_l (M^{-1} s^{-1})$	0,133±0,005

As constantes de partição para o OG e LG mostram que o valor de  $P_o'$  diminui para o segundo antioxidante mostrando-se assim coerente com a existência de uma maior solubilidade deste composto na região oleosa.

De acordo com a Equação 59 o LG apresenta uma maior afinidade para a região oleosa e como tal encontra-se em maior quantidade nesta região, o que origina um valor de  $P_o'$  menor do que o obtido para o OG.

$$P_o' = \frac{(AO)_l}{(AO)_o} \quad (59)$$

Valores destas constantes foram anteriormente obtidos para o galato de octilo para óleo de milho ( $P_o' = 27$ ) e para o galato de dodecilo para azeite ( $P_o' = 17$ ) e óleo de milho ( $P_o' = 17$ ). Verificam-se algumas diferenças entre estes valores e os valores obtidos para o óleo de peixe uma vez que se torna difícil perceber qual a influência da natureza do óleo/azeite no valor das constantes. Além disso o emulsionante utilizado nas duas experiências é distinto.

Relativamente aos valores de  $k_l$  obtidos para o óleo de peixe são bastante distintos daqueles obtidos para óleo de milho e azeite. Para o OG obteve-se um valor de  $k_l = 35$  para o óleo de milho e para o LG um valor de  $k_l = 57$  e  $k_l = 59$  para óleo de milho e azeite, respetivamente. O valor de  $k_l$  depende do meio, daí as diferenças verificadas entre as diversas experiências.

#### 4.4.3.2. Análise da distribuição do galato de octilo e do galato de dodecilo

Conhecido o valor de  $P_o^I$  e aplicando as equações do modelo cinético da pseudofase simplificado (MCPS), obtém-se a percentagem de galato de octilo (OG) e galato de dodecilo (LG) presente nas regiões oleosa e interfacial da emulsão, para cada fração de emulsificante.

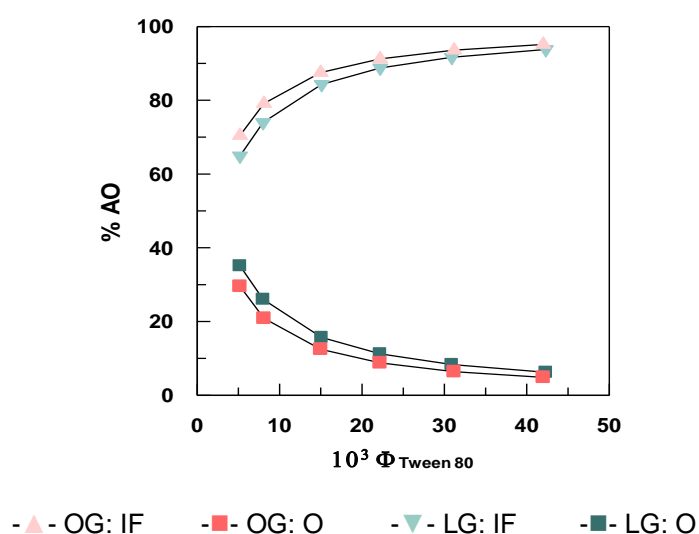


Figura 36. Variação da percentagem de OG e LG nas fases oleosa (O) e interfacial (IF) do sistema emulsionado.

Analisando a Figura 36 verifica-se que o OG e o LG apresentam um comportamento idêntico relativo à sua distribuição nas regiões interfacial e oleosa da emulsão. Para a menor fração de emulsificante utilizada ( $\Phi_1 = 0,005$ ), a percentagem de galato de octilo (OG) que se encontra na região interfacial é de aproximadamente 61%. Aumentando essa fração para 0,042 a percentagem deste derivado na interface aumenta para cerca de 93%. No que diz respeito ao galato de dodecilo (LG) essas percentagens são de 65% e 94%, respetivamente, para uma fração de emulsificante de 0,005 e 0,042. Mais uma vez verificou-se uma diminuição da diferença entre os AOs com o aumento da fração de emulsificante.

#### 4.4.4. Análise comparativa da distribuição do ácido gálico e dos seus derivados

Na Tabela 11 encontram-se sumariados todos os valores obtidos para as percentagens de AO na fase aquosa e oleosa numa mistura binária 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato) e numa emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato). Encontram-se ainda registados os valores das constantes de partição,  $P_A^O$ ,  $P_A^I$ ,  $P_O^I$  e os valores de  $k_I$ .

**Tabela 11.** Sumário dos valores das constantes obtidas para o ácido gálico e seus derivados numa mistura binária 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato) e numa emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato).

		GA	MG	PG	BG	OG	LG
<b>Mistura binária 4:6</b>	% (AO) <sub>O</sub>	3,5 <sup>a</sup>	9,4 <sup>a</sup>	34,5 <sup>a</sup>	59,6 <sup>a</sup>	≈ 100 <sup>a</sup>	≈ 100 <sup>a</sup>
	% (AO) <sub>A</sub>	96,5±2,1	90,6 <sup>b</sup>	65,5±0,2	40,4±1,1	≈ 0	≈ 0
	$P_A^O$	0,05±0,03	0,156±0,001	0,792±0,002	2,21±0,10	>> 2,21	>> 2,21
<b>Emulsão 4:6</b>	$P_A^I$	118±19	158±60	376±13	559±127	---	---
	$P_O^I$	---	---	475±15	253±56	183±126	142±37
	$k_I$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	0,082±0,003	0,078±0,005	0,155±0,018	0,162±0,019	0,148±0,009	0,133±0,005

a - valores determinados teoricamente como %AO<sub>O</sub>=100-%AO<sub>A</sub>

b – valor determinado apenas com uma amostra

Pela análise dos resultados anteriormente apresentados conjuntamente com a Figura 37 pode-se perceber como varia a percentagem do ácido gálico e dos seus derivados em cada uma das fases (oleosa, aquosa e interfacial) numa emulsão 4:6 (óleo de peixe/ tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65, [AO] = 3x10<sup>-3</sup> M).

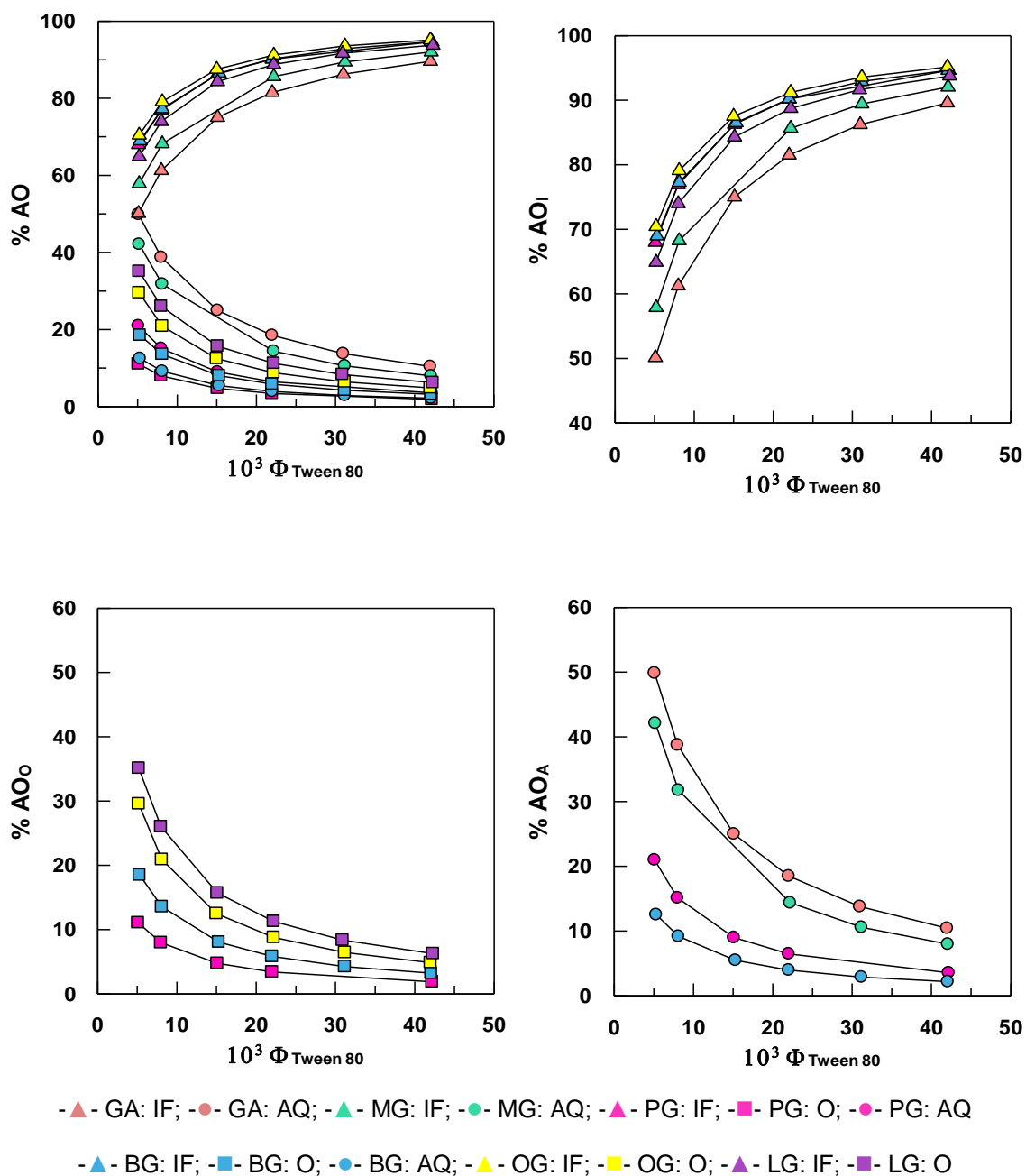


Figura 37. Variação da percentagem do ácido gálico e dos seus derivados no sistema emulsionado (A) na interface (IF) (B), na fase oleosa (O) (C) e na fase aquosa (AQ) (D) do sistema emulsionado.

Na Figura 37 e na Tabela 12 apresentam-se os valores das percentagens do ácido gálico e dos seus derivados presentes nas três regiões da emulsão 4:6 (v/v) óleo de peixe/tampão citrato (0,04 M e pH = 3,65).



**Tabela 12.** Percentagem (em valor aproximado) do ácido gálico e dos seus derivados para as frações de emulsionante de 0,005 e 0,042, nas três regiões da emulsão.

Composto	$\Phi_I$	%AO <sub>I</sub>	%AO <sub>A</sub>	%AO <sub>O</sub>
<b>GA</b>	0,005	50	50	---
	0,042	90	10	---
<b>MG</b>	0,005	58	42	---
	0,042	92	8	---
<b>PG</b>	0,005	68	21	11
	0,042	95	3	2
<b>BG</b>	0,005	69	13	18
	0,042	95	2	3
<b>OG</b>	0,005	70	---	30
	0,042	95	---	5
<b>LG</b>	0,005	65	---	35
	0,042	94	---	6

Analisando-se em primeiro lugar os resultados para uma fração de emulsionante de 0,005, verifica-se que 50% do ácido gálico (GA) se distribui na região aquosa sendo o antioxidante que tem maior afinidade com esta região. O derivado de cadeia mais curta estudado, o galato de metilo (MG), apresenta um comportamento idêntico ao ácido gálico. No entanto, a percentagem deste derivado presente na interface é ligeiramente superior. O antioxidante que se distribui em maior percentagem na interface e por isso, aquele que, em princípio, vai ser um melhor inibidor das reações de oxidação lipídica, é o galato de octilo (OG) com uma percentagem de 70%. Este antioxidante, bem como o galato de dodecilo (LG) foram os AOs de cadeia longa estudados e são aqueles que se distribuem apenas entre a região interfacial e a oleosa. Os antioxidantes de cadeia intermédia estudados foram o galato de propilo (PG) e o galato de butilo (BG) que apresentam um comportamento semelhante relativamente à sua distribuição nas regiões da emulsão, estando presentes em percentagens aproximadas na região interfacial, na região oleosa e na região aquosa. A relação  $(\%OG)_I \approx (\%BG)_I \approx (\%PG)_I > (\%LG)_I$  mostra que não existe correlação entre a hidrofobicidade do antioxidante e a percentagem de AO presente na interface.

Já na região aquosa a relação  $(\%BG)_A < (\%PG)_A < (\%MG)_A < (\%GA)_A$  permite verificar que, diminuindo a hidrofobicidade do AO, a sua percentagem aumenta. Assim, verifica-se a existência de uma correlação inversa entre estes dois parâmetros. Na região oleosa, a percentagem de AO correlaciona-se diretamente com a

hidrofobicidade. Um aumento dessa hidrofobicidade promove o aumento da percentagem de AO segundo a relação  $(\%PG)_o < (\%BG)_o < (\%OG)_o < (\%LG)_o$ .

A percentagem de AO presente na emulsão na região interfacial aumenta quando a fração de emulsionante Tween 80 aumenta para 0,042, verificando-se desta forma uma influência significativa da fração de emulsionante sobre a percentagem de AO presente em cada uma das fases da emulsão. De notar que com o aumento da fração de emulsionante a diferença de percentagem de AO existente na interface entre os AOs diminui consideravelmente em especial para os compostos mais lipofílicos. Assim, a diferença de percentagem na interface para a fração de 0,5% de emulsionante para os compostos GA e OG é de cerca de 20%, diminuindo para cerca de 5% para emulsões contendo 4,2% de emulsionante. Pela observação destes dados será esperada uma menor diferença na eficácia antioxidante dos compostos em emulsões contendo maiores percentagens de emulsionante.

À medida que ocorre um aumento da hidrofobicidade dos antioxidantes verifica-se que os valores das constantes de partição,  $P_A^o$ , incrementam o seu valor desde 0,05 até um valor significativamente superior, 2,21. Esta constante para o GA apresenta um valor bastante reduzido ( $P_A^o = 0,05 \pm 0,03$ ) devido à elevada solubilidade dos ácidos fenólicos em água. Atendendo aos valores obtidos para as constantes de partição binária (Tabela 11) e aos obtidos para as percentagens do ácido gálico e dos seus derivados (Tabela 12) verifica-se que os AOs solúveis na região aquosa e na oleosa são o PG e o BG. Para o OG e o LG as constantes de partição binária não se determinaram, tal como referido anteriormente, devido à elevada absorvância do óleo de peixe relativamente à do antioxidante.

Os valores das constantes  $P_A^I$  e  $P_O^I$  são elevados para todos os derivados variando em função do antioxidante. O valor de  $P_A^I$  aumenta à medida que aumenta a hidrofobicidade dos AOs e uma relação inversa é verificada no que respeita aos valores de  $P_O^I$ .

Uma vez que só se modifica o tamanho da cadeia alquílica, confirma-se que o mecanismo de reação é idêntico para todos os antioxidantes uma vez que os valores obtidos para a constante  $k_I$  são bastante similares para os derivados do ácido gálico.

#### 4.4.5. Avaliação da atividade antioxidante – Teste de estufa de Schaal

Estudou-se, inicialmente, a atividade antioxidante do ácido gálico e dos seus derivados em emulsões constituídas por óleo de peixe e tampão citrato (0,04 M, pH = 3,65), com 1% de Tween 80 e contendo 0,6 mM de cada um dos antioxidantes. Submeteram-se as emulsões a um teste de aceleração oxidativa a uma temperatura de 50 °C. Na Figura 38 está representada a variação da percentagem de dienos conjugados em função do tempo (dias) para esta primeira experiência.

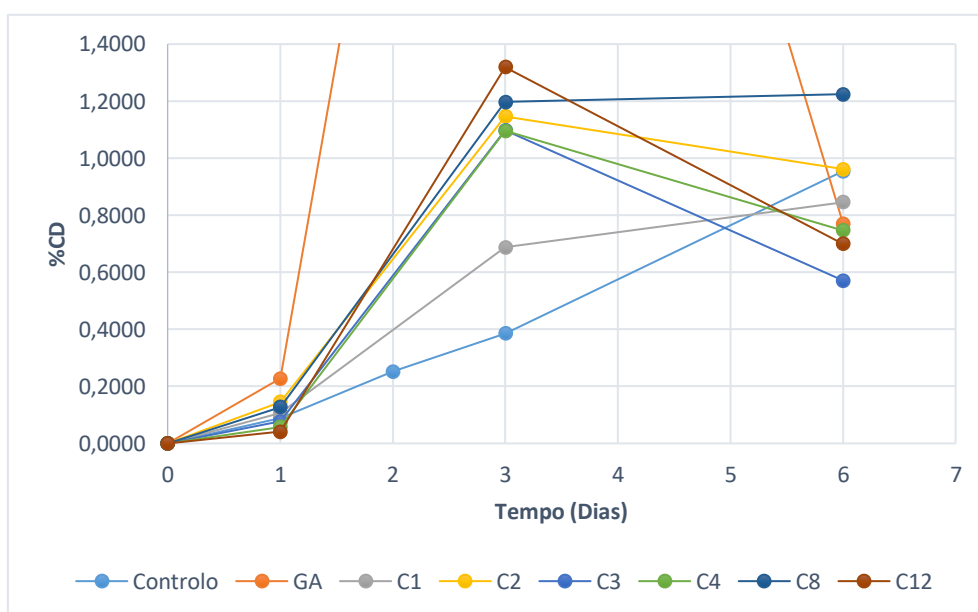
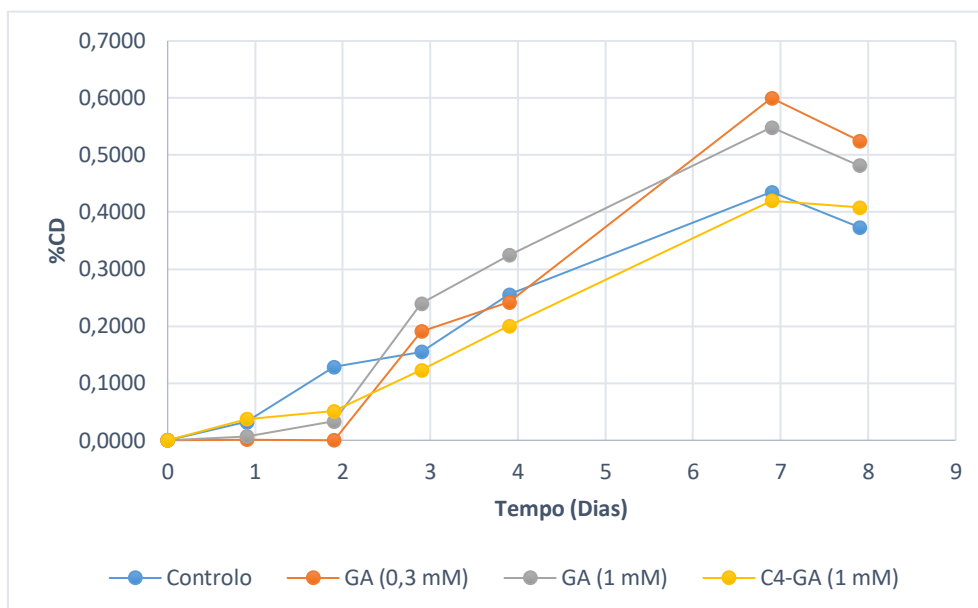


Figura 38. Variação da percentagem de dienos conjugados ao longo do tempo de armazenamento numa estufa termostatzada a 50 °C.

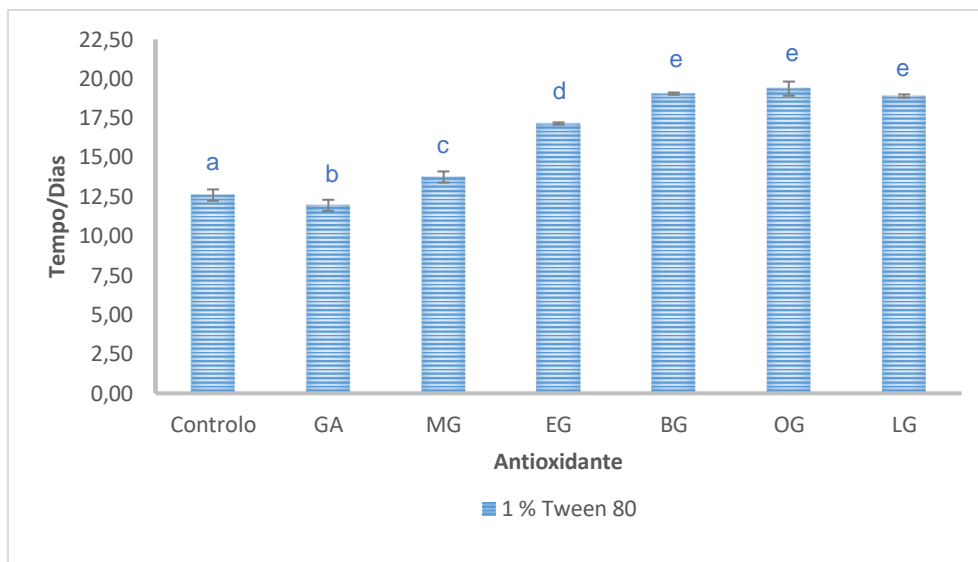
Verificou-se, para uma temperatura de 50 °C e uma concentração de antioxidante na emulsão de 0,6 mM que nenhum AO mostrou efeitos antioxidantes. Pelo contrário, observou-se efeitos pro-oxidantes para todos os AOs.

Existiu então, a necessidade de estudar as condições de ensaio modificando as concentrações de antioxidante. Submeteram-se, ao teste da estufa, emulsões contendo GA numa concentração de 0,3 mM e 1 mM e ainda emulsões contendo BG numa concentração de 1 mM. Além destas amostras colocaram-se na estufa amostras controlo, isto é, amostras sem adição de antioxidante. Os resultados apresentam-se na Figura 39.



**Figura 39.** Variação da percentagem de dienos conjugados ao longo do tempo de armazenamento numa estufa termostaticada a 50 °C, com emulsões contendo diferentes concentrações de antioxidante.

Pela análise dos resultados apresentados na Figura 39, verificou-se a necessidade de aumentar a concentração de antioxidante nas emulsões de modo a serem observados efeitos antioxidantes. Assim, repetiu-se a experiência inicial para uma concentração de antioxidante adicionado às emulsões de 1,25 mM e para uma temperatura de estufa de 40 °C. Determinou-se o grau de oxidação lipídica das amostras ao longo do tempo através da determinação do conteúdo de dienos conjugados. A Figura 40 representa o tempo necessário para o conteúdo de dienos conjugados alcançar o valor de 0,5% nas emulsões com 1% de Tween 80.



**Figura 40.** Tempo para que as emulsões contendo 1% de emulsionante, atinssem o conteúdo em CD de 0,5%. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: emulsões 4:6 (Óleo de peixe/tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 /Tween 80), [AO] = 1,25 mM, T = 40 °C.

De acordo com o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demora a atingir o valor de 0,5%, para a percentagem de emulsionante de 1%, a ordem da atividade antioxidante obtida foi  $OG \approx BG \approx LG > EG > MG > GA$ . O “Paradoxo Polar” prevê que antioxidantes mais polares sejam mais eficazes em meios menos polares e que antioxidantes menos polares sejam mais eficazes em meios mais polares como é o caso de sistemas emulsionados do tipo O/A. Não foi possível observar diferenças na eficácia antioxidante dos galatos de butilo, octilo e dodecilo. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Medina et. al [38] para uma série de ésteres do ácido gálico em emulsões de óleo de peixe/água. Estes autores não observaram diferenças significativas para os galatos de hexilo, dodecilo, octilo, decilo e hexadecilo, mas observaram um decréscimo na atividade antioxidante para o galato de butilo e octadecilo.

A atividade antioxidante numa emulsão depende da partição dos antioxidantes entre as diferentes fases que a constituem, da estabilidade dos antioxidantes e muito particularmente dos fenómenos interfásicos ao nível da interface óleo/água. Desta forma, a concentração de antioxidante na interface terá um papel importante no que respeita à estabilidade oxidativa das emulsões. Os antioxidantes que se encontram em maior percentagem na interface, para uma mesma quantidade de emulsionante, parecem exercer uma melhor atividade antioxidante.

#### 4.4.5.1. Avaliação do efeito da fração de emulsificante na atividade antioxidante

Realizou-se uma segunda experiência em que foram utilizadas, para um mesmo antioxidante, emulsões contendo diferentes quantidades de emulsificante. Na Figura 41 está representado o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a alcançar o valor de 0,5% nas emulsões de 0,5%, 1% e 2% de emulsificante, para alguns antioxidantes (GA, EG, BG, OG e LG).

O tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a alcançar o valor de 0,5% diminuiu com o aumento da percentagem de emulsificante para a maioria dos antioxidantes.

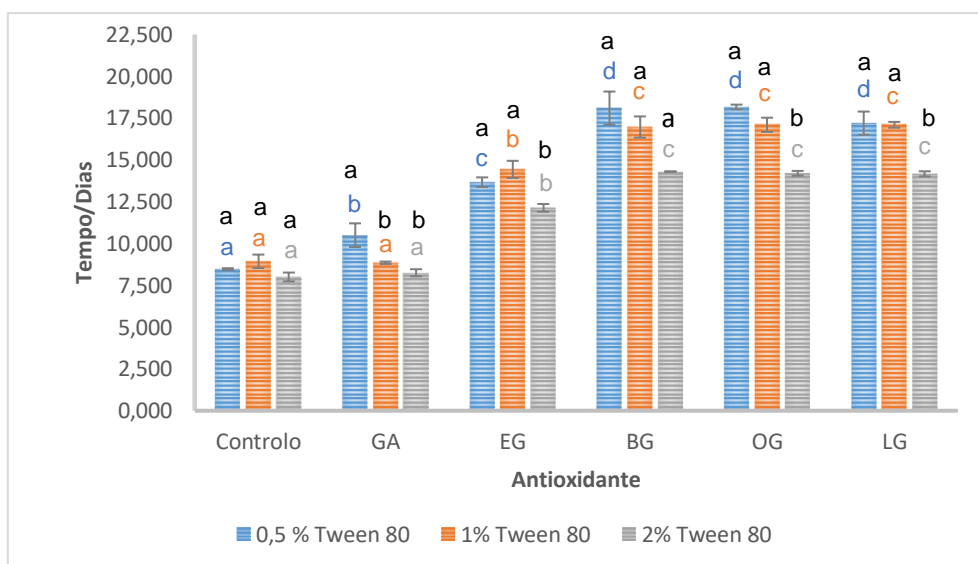


Figura 41. Tempo (Dias) para que as emulsões contendo 0,5%, 1% e 2% de emulsificante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5%. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes; letras coloridas – compostos diferentes, percentagem de Tween 80 igual; letras pretas – compostos iguais, percentagem de Tween 80 diferente). Condições experimentais: emulsões 4:6 (Óleo de peixe/tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 /Tween 80), [AO] = 1,25 mM, T = 40 °C.

De notar que variando a percentagem de Tween 80 no controlo não se verificou uma diferença estatisticamente significativa na estabilidade oxidativa. Na secção Anexos apresenta-se a análise estatística obtida utilizando o software SPSS.

Segundo a distribuição dos antioxidantes nas emulsões, com o aumento da fração de emulsificante, a percentagem de antioxidante na interface, também aumenta. Contudo, ocorre simultaneamente uma diluição do antioxidante na interface que não é suficiente para contrabalançar o acréscimo de AO nessa região.

Verifica-se que os antioxidantes que apresentavam uma cadeia alquílica maior apresentaram também uma maior eficácia antioxidante (BG, OG e LG) embora não se tenha observado diferenças estatisticamente significativas na eficácia antioxidante para uma mesma percentagem de Tween 80. Os antioxidantes de cadeia mais curta (GA e EG) apresentaram uma eficácia menor relacionada com a distribuição dos AOs pelas três regiões da emulsão como se pode verificar pela análise da Tabela 13 existindo uma correlação da %AO<sub>I</sub> com a hidrofobicidade do antioxidante como se indica na Figura 42.

**Tabela 13. Percentagem (em valor aproximado) do ácido gálico e dos seus derivados para as frações de emulsionante de 0,005, 0,01 e 0,02, nas três regiões da emulsão.**

Composto	$\Phi_I$	%AO <sub>I</sub>	%AO <sub>A</sub>	%AO <sub>O</sub>
GA	0,005	50	50	---
	0,01	66	34	---
	0,02	80	20	---
MG	0,005	58	42	---
	0,01	72	28	---
	0,02	84	16	---
PG	0,005	68	21	11
	0,01	79	14	7
	0,02	88	8	4
BG	0,005	69	13	18
	0,01	80	8	12
	0,02	88	5	7
OG	0,005	70	---	30
	0,01	82	---	18
	0,02	90	---	10
LG	0,005	65	---	35
	0,01	72	---	8
	0,02	88	---	12

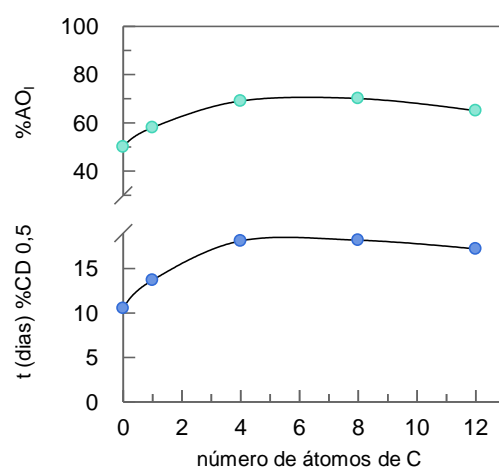


Figura 42. Correlação da distribuição e da eficácia antioxidante com a hidrofobicidade dos AOs para  $\Phi=0,005$ .

Pela análise da tabela pode-se concluir, por outro lado, que a pequena percentagem distribuída na região oleosa parece influenciar positivamente a estabilidade oxidativa em emulsões, ou seja, para uma percentagem semelhante de AO na interface, as emulsões contendo uma maior percentagem de AO na fase oleosa são mais estáveis.



# Capítulo 5 – Conclusão

A utilização de antioxidantes (AOs) na estabilização de emulsões tem vindo a aumentar uma vez que se tem tornando necessário aumentar o tempo de prateleira de vários alimentos constituídos por emulsões. Os AOs utilizados podem-se distribuir por toda a emulsão podendo estes encontrar-se não só nas fases aquosa e oleosa, como também na região interfacial destes sistemas. Assim, a atividade de cada antioxidante nos sistemas emulsionados vai depender de diversos fatores tais como a temperatura, o pH, a própria estrutura do antioxidante considerado e da sua localização no sistema emulsionado. Muitos dos antioxidantes utilizados na indústria alimentar apresentam uma elevada solubilidade em água. Com o objetivo de encontrar novos antioxidantes com menor solubilidade na região aquosa da emulsão e, conseqüentemente maior solubilidade nas regiões oleosa e interfacial têm sido desenvolvidos novos AOs que cumpram estas características.

Ao longo deste trabalho estudou-se a distribuição do ácido gálico e dos seus derivados (todos compostos comerciais) em emulsões alimentares modelo através da determinação das constantes de partição do AO entre as regiões aquosa-interfacial e oleosa-interfacial de emulsões alimentares modelo. Estimou-se ainda a constante de velocidade,  $k_i$ , da reação entre os antioxidantes e os iões 4-hexadecilbenzenodiazonio que decorre na interface. Após a análise dos resultados, concluiu-se que dos dois ácidos de cadeia curta estudados o ácido gálico (GA) está distribuído em igual percentagem nas regiões aquosa e interfacial e o galato de metilo (MG) apresenta uma percentagem ligeiramente mais elevada na interface relativamente ao primeiro embora também se encontre distribuído somente pela interface e fase aquosa. Já os derivados de cadeia intermédia, galato de propilo (PG) e galato de butilo (BG), mostraram estar distribuídos nas três regiões da emulsão, sendo na interface que apresentam uma maior percentagem. O galato de octilo (OG) e o galato de dodecilo (LG) foram os antioxidantes de cadeia longa estudados e distribuem-se ambos apenas entre as regiões oleosa e interfacial. O antioxidante que apresentou a maior percentagem na região interfacial foi o OG e, deste modo deveria ser o AO a apresentar a maior capacidade para proteger a emulsão das reações da oxidação lipídica. Em relação aos valores de  $P_o^I$  obtidos observou-se uma diminuição com o aumento da hidrofobicidade dos derivados do ácido

gálico. Pelo contrário, os valores de  $P_A^I$  aumentam à medida que aumenta a hidrofobicidade dos compostos.

Por análise dos valores de  $k_I$  obtidos para os galatos, verificou-se que estes são muito semelhantes entre si o que indica que existe uma reatividade intrínseca muito semelhante para todos os antioxidantes dado que unicamente se modifica o tamanho da cadeia alquílica.

Realizou-se ainda o estudo da atividade antiradicalar dos compostos através da aplicação do método do DPPH\*. Pode-se concluir que, em solução metanólica, ao fim de 5 minutos os galatos não apresentam diferença significativa na sua atividade frente ao radical DPPH, consequência da estrutura fenólica comum a todos eles. No entanto, os valores de  $EC_{50}$  obtidos para o ácido gálico diferem ligeiramente dos obtidos para os seus derivados.

Realizou-se o estudo da eficácia dos diversos antioxidantes em emulsões óleo de peixe/ Tween 80/ tampão citrato através do teste de estufa de Schaal. Inicialmente o estudo foi realizado para emulsões contendo 1% de Tween 80 e verificou-se que o antioxidante que apresentou uma maior eficácia antioxidante foi o galato de octilo (OG), o mesmo antioxidante que se descobriu apresentar uma maior percentagem na região interfacial. No entanto, pela análise estatística verifica-se que os valores obtidos para o galato de octilo (OG), galato de butilo (BG) e galato de dodecilo (LG) não diferem significativamente entre si, o que está de acordo com a pequena diferença observada na percentagem deste AO na interface. Posteriormente foi realizado um novo teste de estufa, neste caso variando a fração de Tween 80 nas emulsões (0,5%, 1% e 2%). Constatou-se que o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demora a alcançar o valor de 0,5% diminui com o aumento da percentagem de emulsionante. Segundo a distribuição dos antioxidantes nas emulsões, com o aumento da fração de emulsionante, a percentagem de antioxidante na interface, também aumenta. Contudo, ocorre simultaneamente uma diluição do antioxidante na interface que não é suficiente para contrabalançar este aumento de AO nessa região. Para emulsões com a fração de emulsionante mais elevada ( $\Phi=0,042$ ), apesar de os AOs apresentarem uma percentagem semelhante na interface, verificou-se que as emulsões contendo AO distribuído na interface e na fase oleosa foram significativamente mais estáveis que as emulsões contendo AO distribuído apenas pela interface e fase aquosa.

Com este estudo foi então possível aumentar significativamente a estabilidade oxidativa de emulsões contendo óleo de peixe, normalmente muito instáveis do ponto

de vista químico e de muito difícil proteção. O AO mais adequado para efetuar esta proteção foi o OG, antioxidante já permitido por lei (E311) para utilização em alimentos.

A concentração necessária para efetuar esta proteção foi um pouco elevada, 1,25 mM, mas ainda dentro dos limites utilizados em produtos dietéticos onde este AO pode ser utilizada até cerca de 1,4 mM [1]. Para obter a máxima eficácia antioxidante por parte deste deverá ser utilizada a quantidade mínima possível de emulsionante necessária para estabilizar a emulsão fisicamente.



# Capítulo 6 – Bibliografia

1. Regulamento (UE) N.º 1129/2011 da Comissão de 11 de Novembro de 2011 que altera o anexo II do regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares, *Jornal oficial da União Europeia*: p. L295/46.
2. V.C., Ramalho, N., Jorge, Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos, *Química Nova*, 2006, **29** (4): p. 755-760.
3. M. S., Ann-Dorit, The influence of ingredients or lipophilized antioxidants on the oxidative stability of fish oil enriched food systems, PhD Thesis, National Food Institute, Division of Seafood Research, 2010, Technical University of Denmark, p. 1-17.
4. D.W.S., Wong, Química de los alimentos: Mecanismos y teoría, 1989, p. 1-10.
5. P., Jan, Introduction, Antioxidants in food - practical applications, *Journal of Food Science and Technology*, 2001, p. 1-17.
6. R., Antoniassi, Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras, Boletim do centro de pesquisa e processamento de alimentos. 2001, **19**: p. 353-380.
7. H.-D., Belitz, *Journal of Food Chemistry*, 1999, Springer. p. 184-202.
8. M.B., Fernanda, A.F., Margarida, Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante, *Química Nova*, 1999.
9. R.J., Hamilton, J.B., Rossell, B.J.F., Hudson, J. Loliger, Rancidity in Foods. 1983.
10. R.J., Sims, J. A., Fioriti, Handbook of Food Additives, 2nd Edition, Vol. II. 1980.

11. O.R., Fennema, Food Chemistry, 4rd Edition, CRC Press, 2007.
12. J., Velasco, M.C. Dobarganes, G. Márquez-Ruiz, Antioxidant activity of phenolic compounds in sunflower oil-in-water emulsions containing casinate and lactose, *Journal of Lipid Science and Technology*, 2004, **106**: p. 325-333.
13. L., Fernando, S.M., Maria, Indústrias Alimentares - Aditivos e tecnologia, 2007. p. 54-56.
14. B.J.F., Hudson, The mechanism of antioxidant in vitro, Food Antioxidants, p. 1-18.
15. L.C.B.M.R.V., Ross, Phenols and Antioxidants, Antioxidants in the Chemistry of phenols, part 2, 2003. p. 839-907.
16. W.R.D.A.L., David, R.E., Ronald , Antioxidants, Food Lipids - Chemistry, Nutrition and Biotechnology, 2002, p. 507-534.
17. Shahidi F., N.M., Food phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Applications, 1995.
18. M. N. Peyrat-Maillard, S.B. C., Berset, Talanta, 2000, **51**(709).
19. Z. Lu, G. N. P. S., Belton, H. Tong, B. Zhao, Neurochemistry International, 2006, **48**: p. 263-274.
20. I. Kubo, N.M. P. Xiao, H. Haraguchi, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**: p. 3533-3539.
21. L.-L. Lu, X.-Y.L., *Journal of Chemical Engeneiring*, **52** (37).
22. E.N., Frankel, Oxidation in multiphase systems, Lipid Oxidation, 2005, p. 259-275.
23. W.L., Porter, Paradoxical behavior of antioxidants in food and in biological systems, Antioxidants: Chemical, Physiological, Nutritional and Toxicological Aspects, 1993, 93-122.

24. M.S., Ann-Dorit et al., The efficacy of compounds with different polarities as antioxidants in emulsions with omega-3 lipids, *Journal of American Oil Chemists Society*, 2011, **88**: p. 489-502.
25. E.N., Frankel et al., Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, **42**: p. 1054-1059.
26. M.M., Laguerre, et al., Relationship between Hydrophobicity and Antioxidant Ability of "Phenolipids" in Emulsion: A parabolic Effect of the Chain Length of Rosmarinate Esters, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, **58**: p. 2869-2876.
27. L. B., Sonia, S. P., Veronica, B. D, Carlos, Effect of emulsifier hydrophile-lipophile balance and emulsifier concentration on the distributions of gallic acid, propyl gallate, and tocopherol in corn oil emulsions, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2013(389): p. 1-9.
28. L.B., Sonia, et al., Distribution and antioxidant efficiency of Resveratrol in stripped corn oil emulsions, *Antioxidants*, 2014, **3**: p. 212-228.
29. L.B., Sonia, et al., Temperature and emulsifier concentration effects on gallic acid distribution in a model food emulsion, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012. **370**: p. 73-79.
30. K., Gunaseelan, et al., Determining a-tocopherol distributions between the Oil, Water and Interfacial Regions of Macroemulsions: Novel Applications of Electroanalytical Chemistry and a Pseudophase Kinetic Model, *Journal of Colloid Interface Science*, 2006, **123-126**: p. 303-311.
31. L.B., Sonia, et al., Distribution of catechol in emulsions, *Journal of Physical Organic Chemistry*, 2013.
32. R.G., Gianfranco, B., Lucia, Reactivity Control by Aqueous Amphiphilic Self-Assembling Systems, Reactions and synthesis in surfactant systems, **100**: p. 182.

33. L.B., Sonia, Estabilidad Oxidativa y Distribución de antioxidantes en emulsiones formadas por aceites vegetales de uso culinário, Departamento de Quimica Fisica, Universidade de Vigo, 2013.
34. H., Yoshida, Influence of fatty acids of different unsaturation in the oxidation of purified vegetable oils during microwave irradiation, *Journal of Scientific Food Agriculture*, 1993, **62**: p. 41-47.
35. M.P., Doyle, W.J., Bryker, Alkyl-Nitrite-Metal Halide Deamination Reactions. 6. Direct Synthesis of Arene Diazonium Tetrafluoroborates Salts from Aromatic Amines, ter-Butyl Nitrite and Boron Trifluoride Etherate in Anhydrous Media, *Journal of Organic Chemistry*, 1979, **44**(9): p. 1572-1574.
36. P. Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Journal of Science and Technology*, 2004, **26**(2): p. 211-219.
37. L. B., Sonia, et al., Maxima in antioxidant distributions and efficiencies with increasing hydrophobicity of gallic acid and its alkyl esters. The pseudophase model interpretation of the "Cut-off effect, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2013, **61**: p. 6533-6543.
38. M.J., González, M., Isabel, M., Olivia, S., Lucas, M. Ricardo, C., Juan, Antioxidant activity of alkyl gallates and glycosyl alkyl gallates in fish oil in water emulsions: Relevance for their surface active properties and of the type of emulsifier, *Journal of Food Chemistry*, 2015, **183**: p. 190-196.



# ***Anexos - Informação Suplementar***

# 1. Avaliação da Atividade Antiradicalar

## 1.1. Método do DPPH•

Para completar a seção 4.2.1 do capítulo 4 apresentam-se os gráficos correspondentes à variação da absorvância do radical de DPPH à medida que ele reage com o antioxidante ao longo do tempo, em segundos e gráficos relativos à variação da percentagem de DPPH• em função da relação mol AO/mol DPPH•.

### 1.1.1. Ácido Gálico (GA)

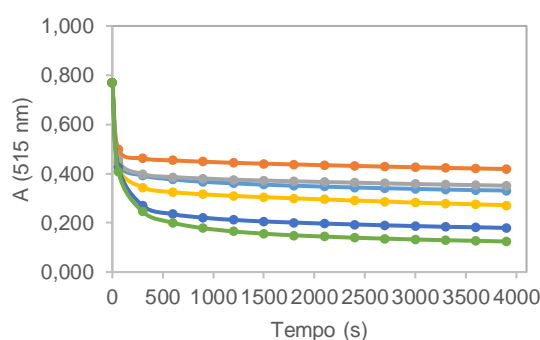


Figura 43. Variação da absorvância do radical DPPH• ( $\lambda=515$  nm) na presença de diferentes concentrações de ácido gálico -●- 0,061 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,081 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,10 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,12 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,14 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,16 mol de AO/mol DPPH•, T=25°C.

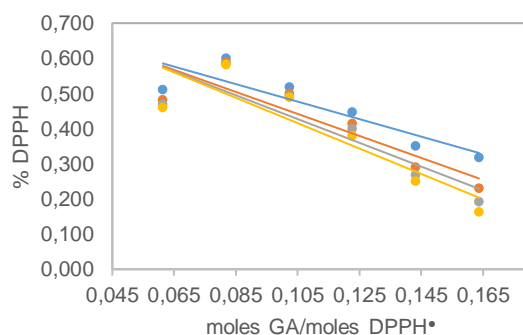


Figura 44. Representação da variação da percentagem de DPPH• com a concentração de ácido gálico, expressa em mol AO/mol DPPH•, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear. -●- 5 minutos, -●- 15 minutos, -●- 30 minutos, -●- 60 minutos

### 1.1.2. Galato de Metilo (MG)

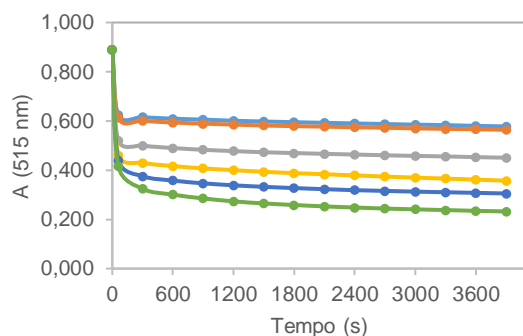


Figura 45. Variação da absorvância do radical DPPH\* ( $\lambda=515$  nm) na presença de diferentes concentrações de galato de metilo -●- 0,055 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,073 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,091 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,11 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,13 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,15 mol de AO/mol DPPH\*, T=25°C.

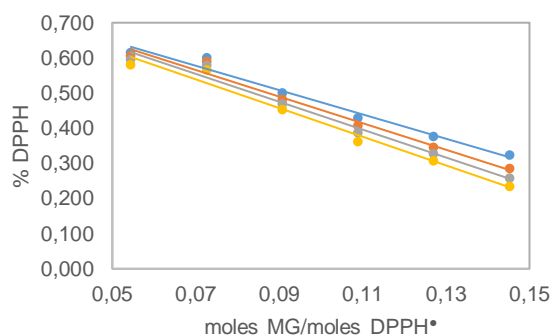


Figura 46. Representação da variação da percentagem de DPPH\* com a concentração de galato de metilo, expressa em mol AO/mol DPPH\*, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear. -●- 5 minutos, -●- 15 minutos, -●- 30 minutos, -●- 60 minutos

### 1.1.3. Galato de Etilo (EG)

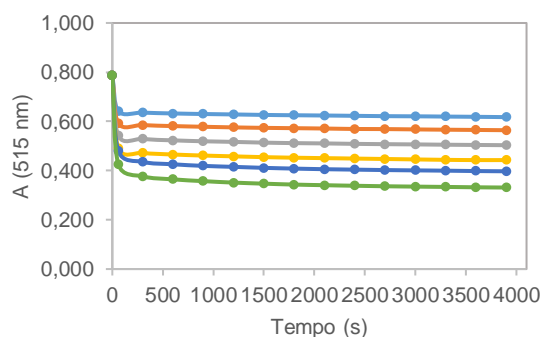


Figura 47. Variação da absorvância do radical DPPH\* ( $\lambda=515$  nm) na presença de diferentes concentrações de galato de etilo -●- 0,046 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,062 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,077 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,093 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,11 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,12 mol de AO/mol DPPH\*, T=25°C.

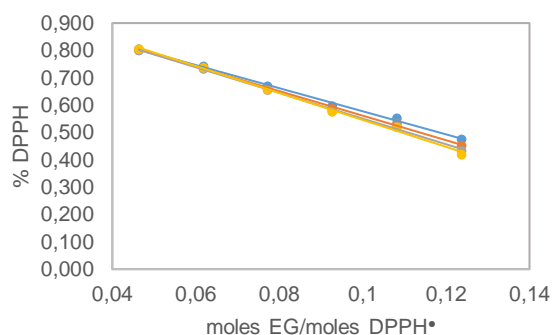


Figura 48. Representação da variação da percentagem de DPPH\* com a concentração de galato de etilo, expressa em mol AO/mol DPPH\*, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear.

-●- 5 minutos, -●- 15 minutos, -●- 30 minutos, -●- 60 minutos

#### 1.1.4. Galato de Propilo (PG)

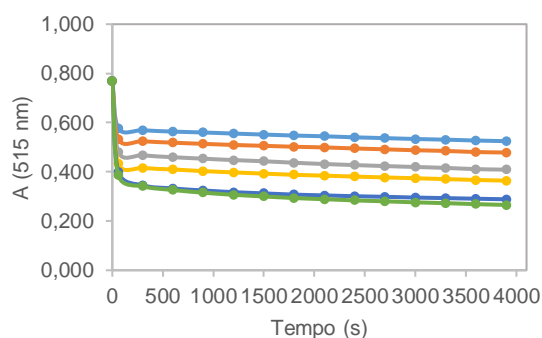


Figura 49. Variação da absorvância do radical DPPH\* ( $\lambda=515$  nm) na presença de diferentes concentrações de galato de propilo -●- 0,051 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,065 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,084 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,10 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,12 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,13 mol de AO/mol DPPH\*,  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

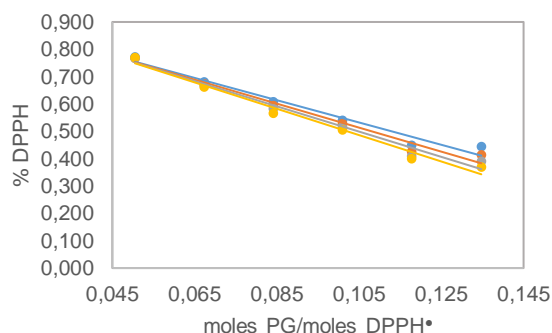


Figura 50. Representação da variação da percentagem de DPPH\* com a concentração de galato de propilo, expressa em mol AO/mol DPPH\*, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear.

-●- 5 minutos, -●- 15 minutos, -●- 30 minutos, -●- 60 minutos

### 1.1.5. Galato de Octilo (OG)

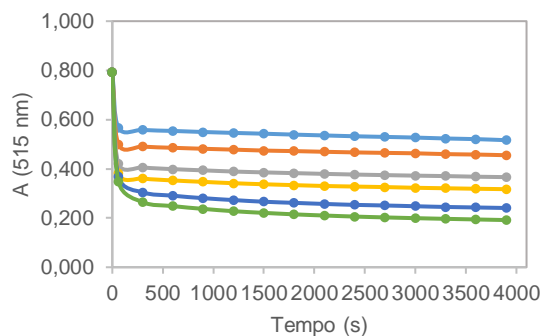


Figura 51. Variação da absorvância do radical DPPH\* ( $\lambda=515$  nm) na presença de diferentes concentrações de galato de octilo -●- 0,053 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,070 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,088 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,11 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,12 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,14 mol de AO/mol DPPH\*,  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

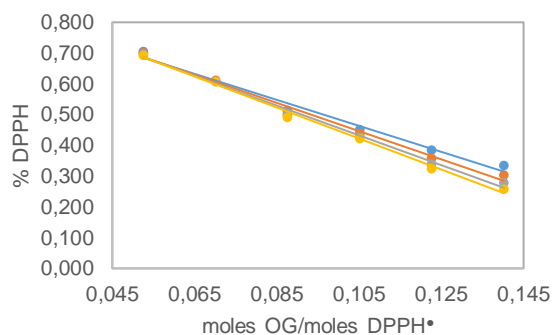


Figura 52. Representação da variação da percentagem de DPPH\* com a concentração de galato de octilo, expressa em mol AO/mol DPPH\*, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear. -●- 5 minutos, -●- 15 minutos, -●- 30 minutos, -●- 60 minutos

### 1.1.6. Galato de Dodecilo (LG)

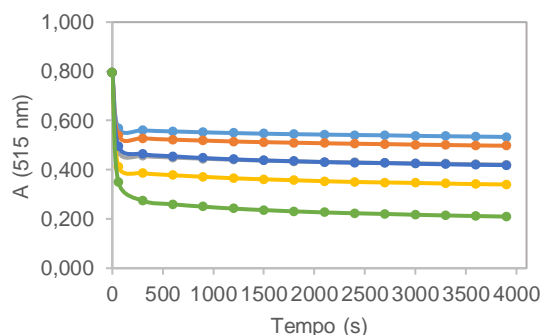


Figura 53. Variação da absorvância do radical DPPH\* ( $\lambda=515$  nm) na presença de diferentes concentrações de galato de dodecilo -●- 0,046 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,062 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,077 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,093 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,11 mol de AO/mol DPPH\*, -●- 0,12 mol de AO/mol DPPH\*,  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

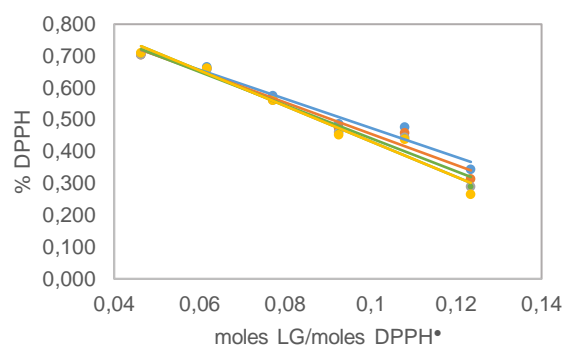


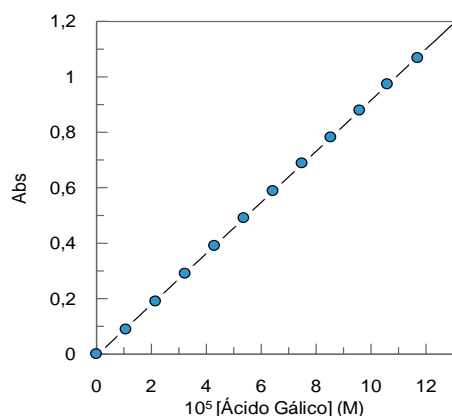
Figura 54. Representação da variação da percentagem de DPPH\* com a concentração de galato de dodecilo, expressa em mol AO/mol DPPH\*, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear  
-●- 5 minutos, -●- 15 minutos, -●- 30 minutos, -●- 60 minutos

## 2. Distribuição do ácido gálico e dos seus derivados em sistemas binários óleo de peixe/água

Para obter a percentagem de cada antioxidante estudado na região aquosa ou oleosa de uma mistura binária óleo de peixe/tampão citrato prepararam-se soluções padrão metanólicas de cada um deles com o objetivo de traçar uma reta de calibração. Com a medição espectrofotométrica de cada antioxidante e com a reta de calibração obtiveram-se as percentagens de cada antioxidante na região aquosa ou oleosa da mistura. Este procedimento é apresentado nas figuras e tabelas seguintes.

### 2.1. Ácido Gálico (GA)

Para a determinação da reta de calibração utilizou-se uma solução de ácido gálico  $5,85 \times 10^{-3}$  M em 1 mL de metanol, a qual se encontra representada na Figura 55.



$$Abs = 9216,3484 [GA] - 0,0058$$

**Figura 55.** Reta de calibração do ácido gálico (GA) em solução metanólica a um comprimento de onda de 269 nm e respetiva equação da reta.

Para o procedimento utilizado, conforme esquematizado na Figura 16 da Seção 3.3, realizaram-se várias medições espectrofotométricas da região aquosa das amostras utilizadas neste estudo, obtendo-se os valores médios da absorvância do ácido gálico apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Valores das absorvâncias obtidas para cada uma das amostras contendo ácido gálico.

	Amostra 1	Amostra 2
<b>Absorvância</b>	0,5405	0,5467
	0,5467	0,5567
	0,5405	0,5554
	0,5368	0,5650
	0,5313	0,5560
<b>Média (Abs)</b>	<b>0,5385</b>	<b>0,5558</b>

Com a curva de calibração e interpolando o valor médio das absorvâncias (Média (Abs)) na equação da reta, obtiveram-se as percentagens de ácido gálico correspondentes a cada amostra, na região aquosa. Exemplificam-se os cálculos aplicados para a obtenção destas percentagens utilizando os valores obtidos para a Amostra 1.

Amostra 1
$\overline{Abs}_{amostra1} = 0,53858$ <i>Reta de calibração</i> : $Abs = 9216,3484 [GA] - 0,0058$ $0,53858 = 9216,3484 [GA] - 0,0058$ $[GA] = 5,91 \times 10^{-5} M$ <i>Atendendo à diluição</i> , $5,91 \times 10^{-5} \times 2700 \times 10^{-6} = [GA]_{100\mu L} \times 100 \times 10^{-6}$ $[GA]_{100\mu L} = 1,59 \times 10^{-3} M$ $[GA]_{inicial\ região\ quosa\ mistura\ binária} = 1,68 \times 10^{-3} M$ $\%GA_{região\ quosa} = \frac{1,59 \times 10^{-3}}{1,68 \times 10^{-3}} \times 100$ $\%GA_{região\ quosa} = 95\%$

O mesmo procedimento foi utilizado para a Amostra 2 obtendo-se uma percentagem de ácido gálico na região aquosa de 98%. A percentagem de ácido gálico presente na região aquosa é

$$\%GA_{região\ quosa} = \frac{95 + 98}{2} = 96,5\%$$

$$s_{GA_{região\ quosa}} = \pm \sqrt{\frac{(95 - 96,5)^2 + (98 - 96,5)^2}{1}} = \pm 2,1$$

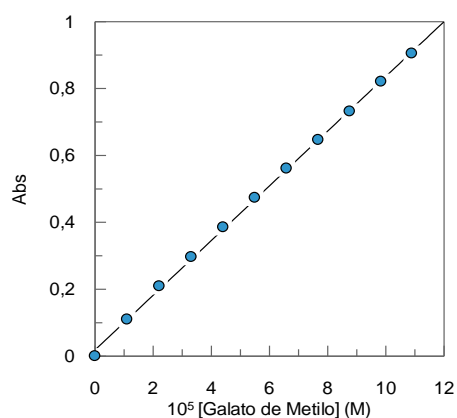
$$\%GA_{região\ quosa} = (96,5 \pm 2,1)\%$$

Nas subsecções seguintes o procedimento anterior é apresentado somente com os gráficos correspondentes e os resultados finais.

## 2.2. Galato de Metilo (MG)

Para a determinação da reta de calibração utilizou-se uma solução de galato de metilo  $6 \times 10^{-3} M$  em 1 mL de metanol, a qual se encontra representada na Figura 56.





$$Abs = 8177,8954 [MG] + 0,0186$$

**Figura 56.** Reta de calibração do galato de metilo (MG) em solução metanólica a um comprimento de onda de 269 nm e respetiva equação da reta.

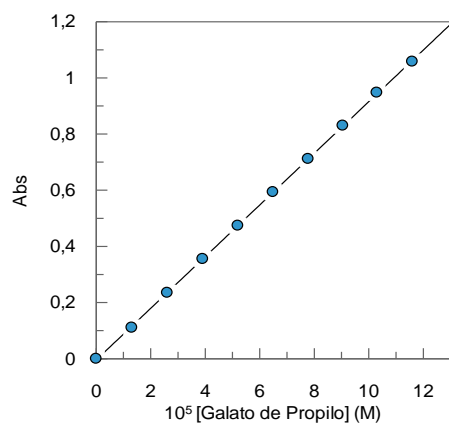
**Tabela 15.** Valores das absorvâncias obtidas para a amostra contendo galato de metilo.

	Amostra 1
Absorvância	0,5034
	0,5082
	0,5112
	0,5201
	0,5157
	0,5288
	0,5183
Média (Abs)	0,5151

$$\% \text{ MG}_{\text{região quosa}} = 90,6\%$$

### 2.3. Galato de Propilo (PG)

Para a determinação da reta de calibração utilizou-se uma solução de galato de propilo  $7,07 \times 10^{-3}$  M em 1 mL de metanol, a qual se encontra representada na Figura 57.



$$Abs = 9196,1293 [PG] - 0,0043$$

Figura 57. Retas de calibração do galato de propilo (PG) em solução metanólica a um comprimento de onda de 269 nm e respetiva equação da reta.

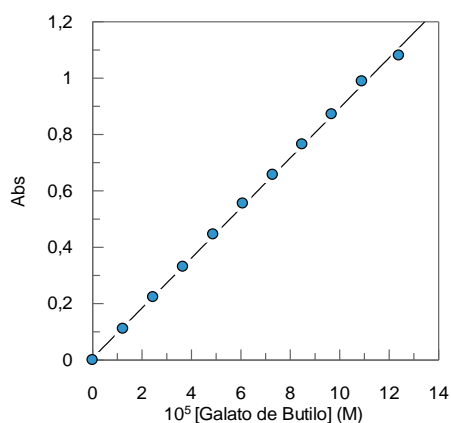
Tabela 16. Valores das absorvâncias obtidas para cada uma das amostras contendo galato de propilo.

	Amostra 1	Amostra 2
Absorvância	0,3577	0,3691
	0,3601	0,3691
	0,3720	0,3594
	0,3535	0,3630
	0,3730	0,3570
	0,3712	0,3559
Média (Abs)	<b>0,3646</b>	<b>0,3622</b>
% PG	<b>65,6</b>	<b>65,3</b>

$$\% PG_{região\ quosa} = 65,5 \pm 0,2 \%$$

## 2.4. Galato de Butilo (BG)

Para a determinação da reta de calibração, utilizou-se uma solução de galato de butilo  $6,63 \times 10^{-3}$  M em 1 mL de metanol, a qual se encontra representada na Figura 58.



$$Abs = 8877,9839 [BG] + 0,0069$$

Figura 58. Reta de calibração do galato de butilo (BG) em solução metanólica a um comprimento de onda de 269 nm e respetiva equação da reta.

Tabela 17. Valores das absorvâncias obtidas para as amostras retiradas de misturas binárias contendo galato de butilo.

	Amostra 1	Amostra 2
Absorvância	0,255	0,2201
	0,25604	0,2306
	0,2585	0,2275
	0,2553	0,2285
	0,2562	0,2287
Média (Abs)	0,2563	0,2271
%BG	41,2	39,6

$$\% BG_{\text{região quosa}} = 40,4 \pm 1,1 \%$$

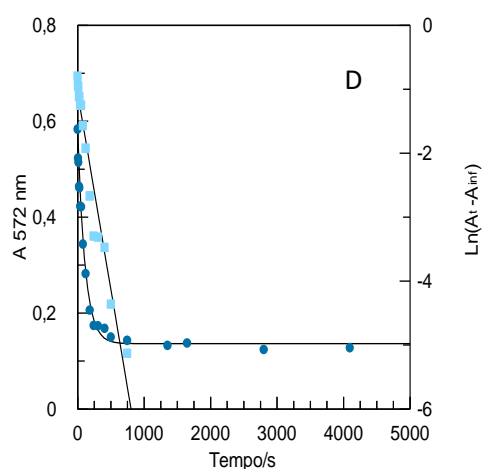
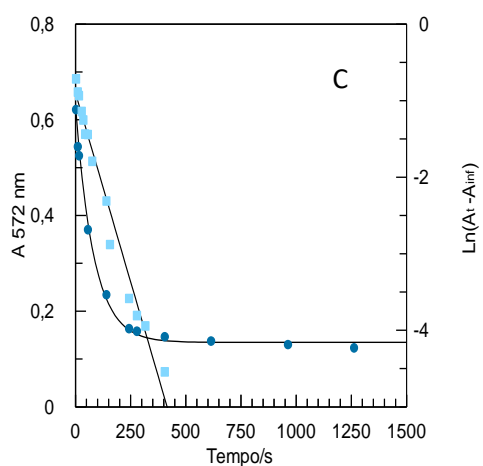
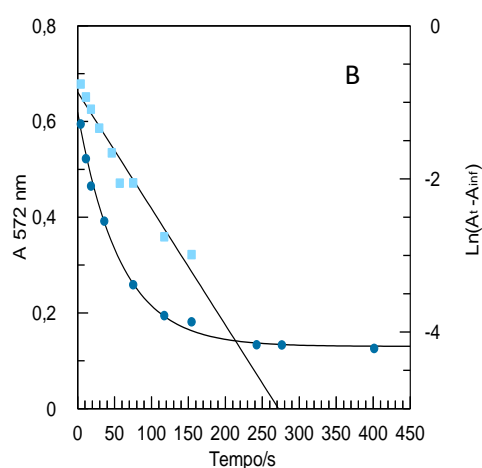
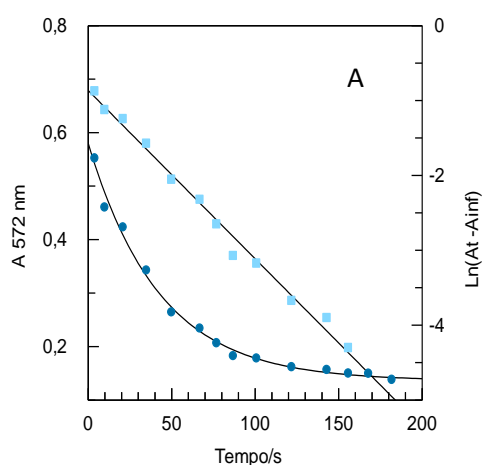
## 2.5. Galato de Octilo e Galato de Dodecilo (OG e LG)

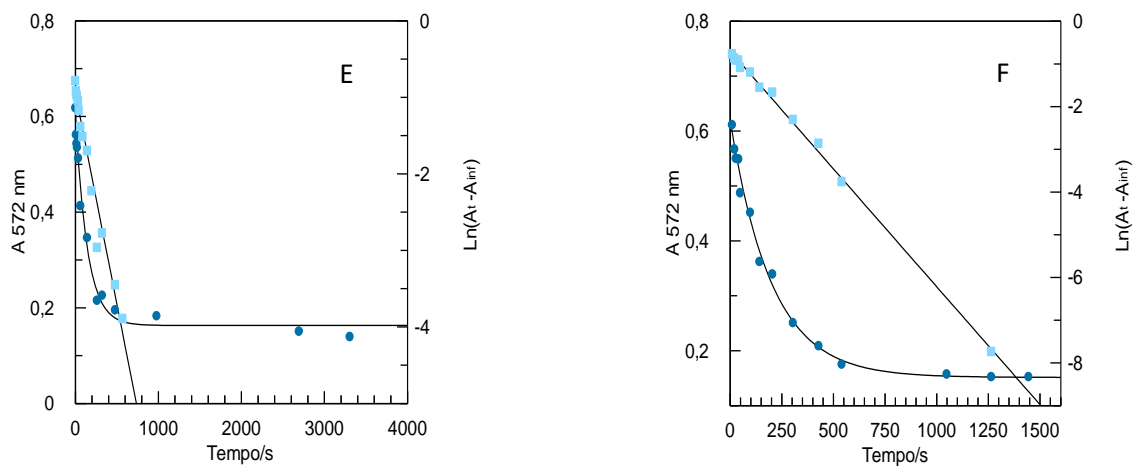
Para ambos os antioxidantes não foi possível a determinação da constante de partição  $P_A^O$  uma vez que a absorvância do óleo é muito superior à banda de absorção do antioxidante e, portanto, esta última é mascarada. Através da medição espectrofotométrica da região aquosa pôde-se concluir que o antioxidante se encontra cerca dos 100% na região oleosa.

### 3. Distribuição do ácido gálico e dos seus derivados em emulsões óleo de peixe/água

De seguida apresentam-se os gráficos da variação da absorvância do corante azoico formado ao longo do tempo e a representação de  $\ln [A_t - A_\infty]$  vs tempo, para os antioxidantes estudados, para diferentes frações de Tween 80 (A, B, C, D, E e F).

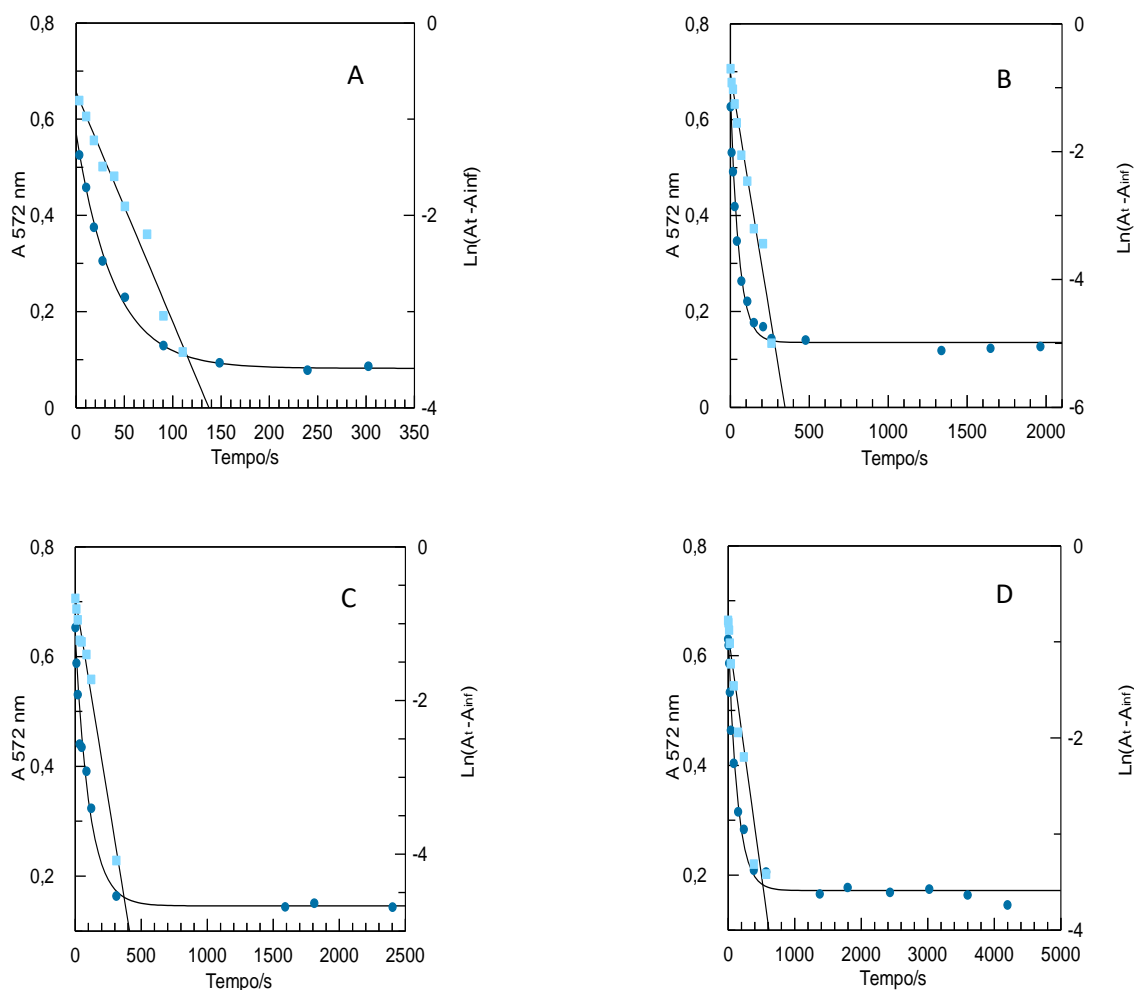
#### 3.1. Ácido Gálico (GA)





**Figura 59.** Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln[A_t - A_{\infty}]$  vs tempo para o GA para as diversas frações de Tween 80 ( $\Phi = 0,005$  (A),  $\Phi = 0,008$  (B),  $\Phi = 0,015$  (C),  $\Phi = 0,022$  (D),  $\Phi = 0,031$  (E),  $\Phi = 0,042$  (F)). Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65/ Tween 80),  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,86 \times 10^{-4}$  M,  $[AO] = 3 \times 10^{-3}$  M,  $[NED] = 0,019$  M,  $T = 25$  °C.

### 3.2. Galato de Metilo (MG)



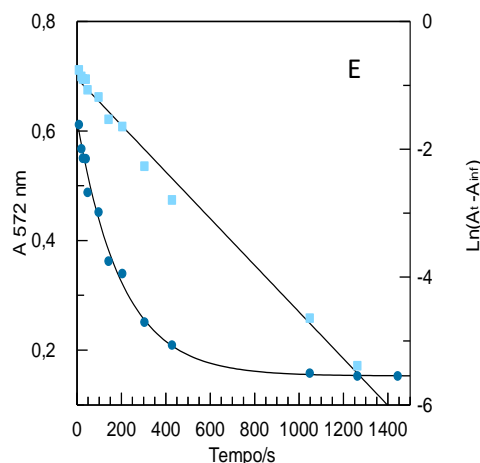
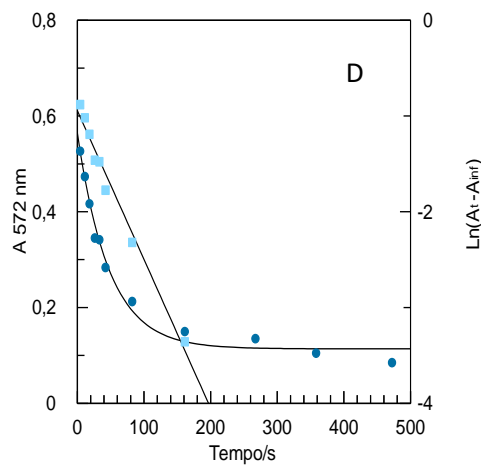
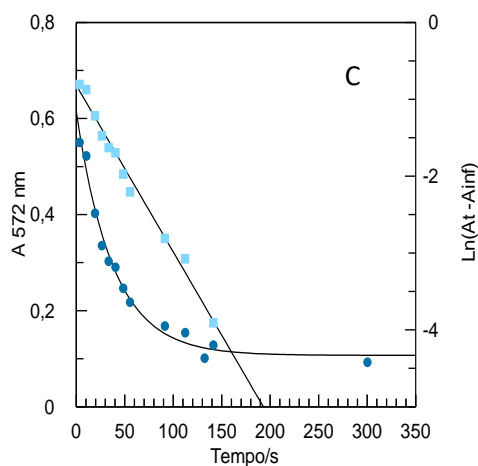
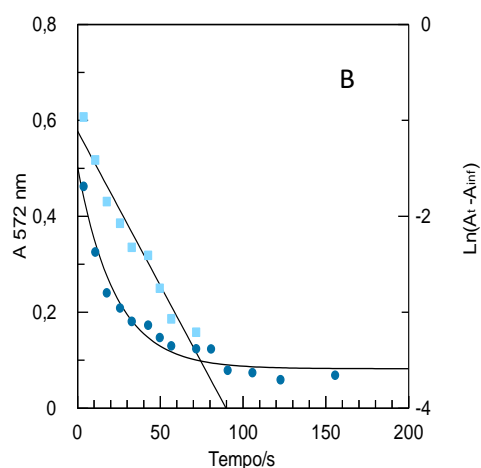
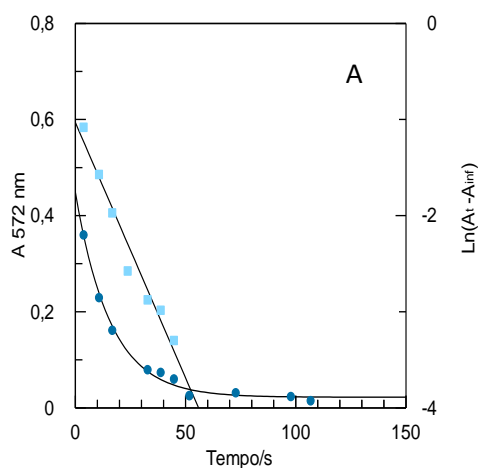


Figura 60. Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln [A_t - A_{\infty}]$  vs tempo para o MG para as diversas frações de Tween 80 ( $\Phi = 0,005$  (A),  $\Phi = 0,008$  (B),  $\Phi = 0,022$  (C),  $\Phi = 0,031$  (D),  $\Phi = 0,042$  (E)). Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65/ Tween 80),  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,86 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[\text{AO}] = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$ ,  $T = 25^\circ \text{C}$ .

### 3.3. Galato de Propilo (PG)



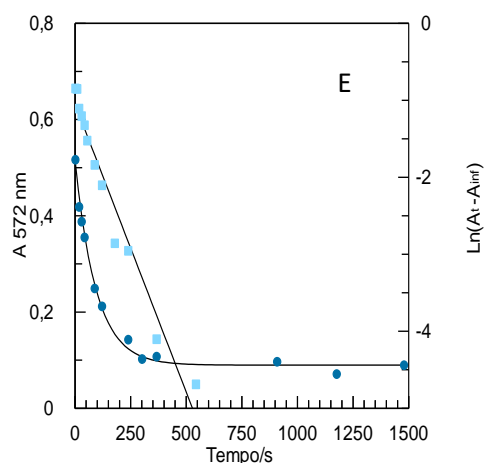
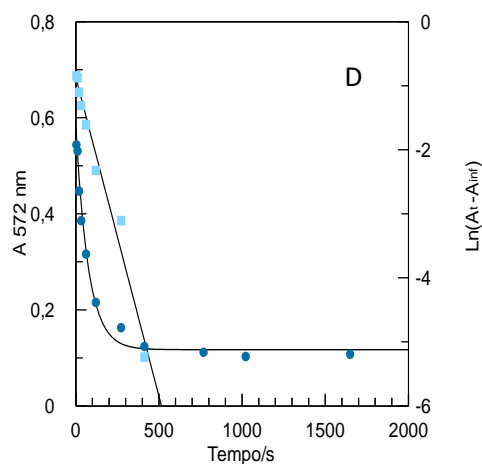
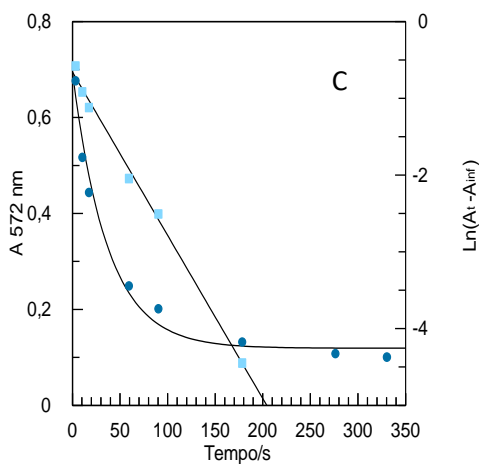
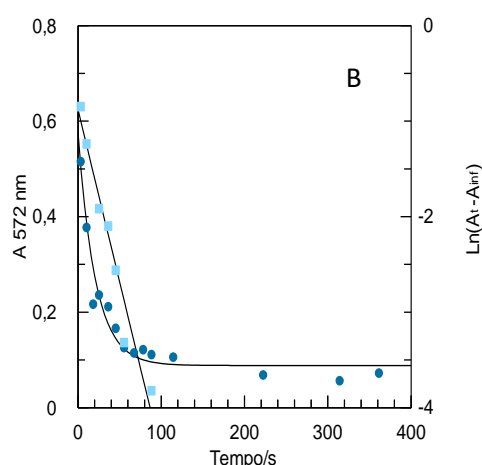
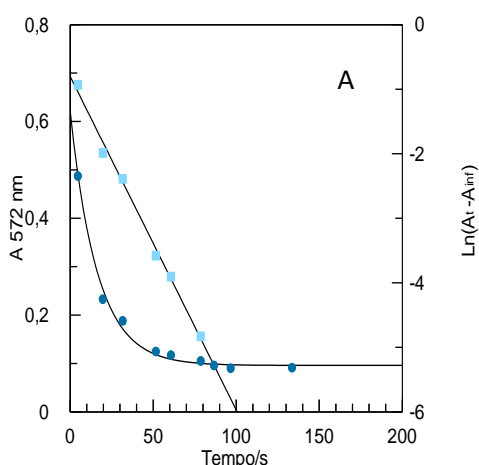


Figura 61. Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln [A_t - A_{\infty}]$  vs tempo para o PG para as diversas frações de Tween 80 ( $\Phi = 0,005$  (A),  $\Phi = 0,008$  (B),  $\Phi = 0,015$  (C),  $\Phi = 0,022$  (D),  $\Phi = 0,042$  (E). Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v), óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65/ Tween 80),  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,86 \times 10^{-4}$  M,  $[AO] = 3 \times 10^{-3}$  M,  $[NED] = 0,019$  M,  $T = 25$  °C.

### 3.4. Galato de Butilo (BG)



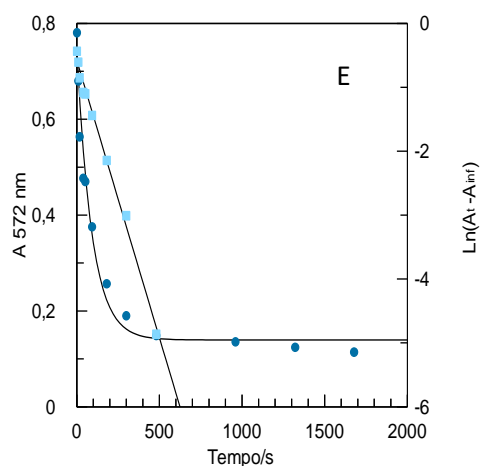
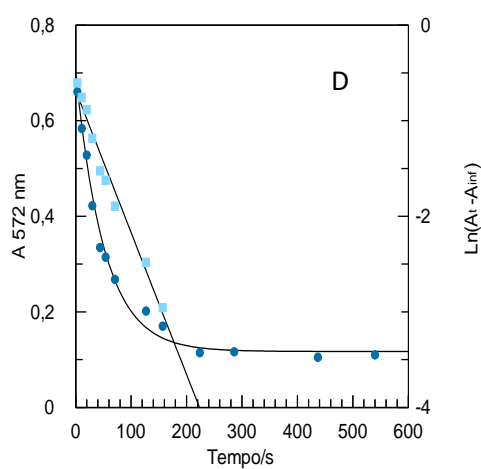
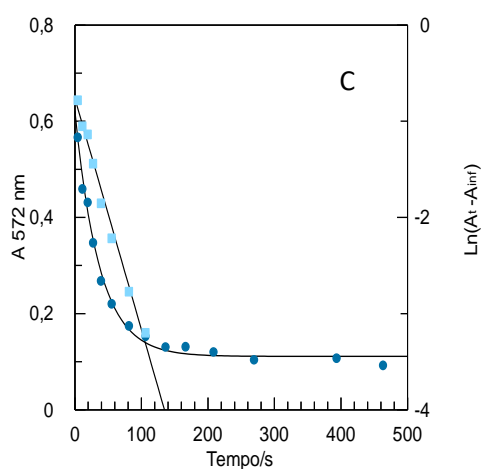
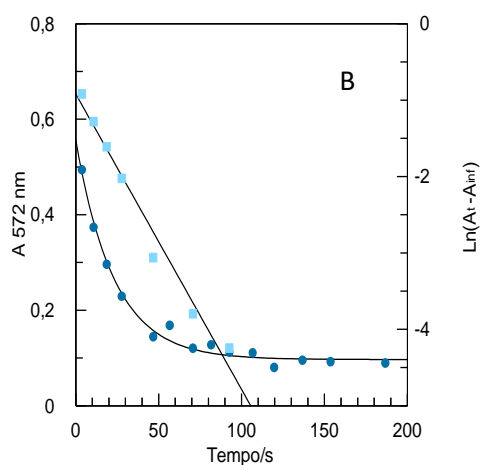
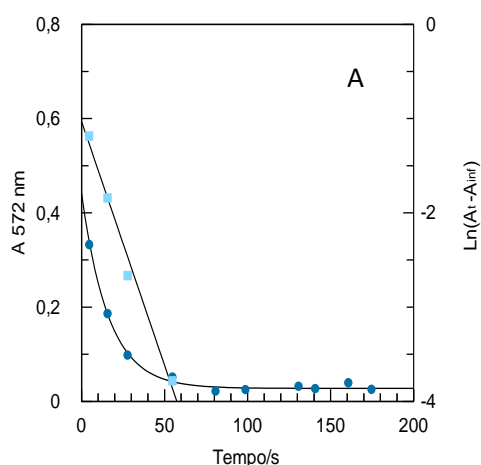
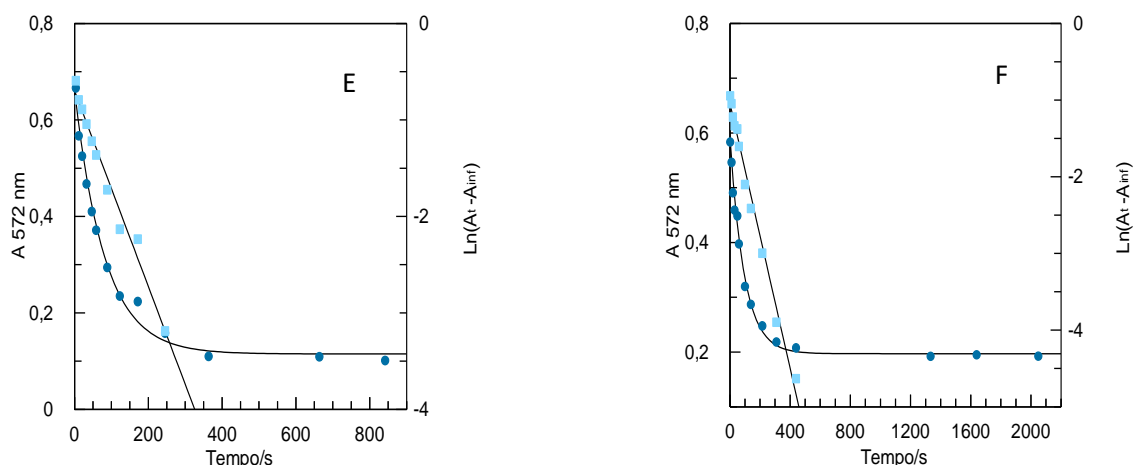


Figura 62. Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln [A_t - A_\infty]$  vs tempo para o BG para as diversas frações de Tween 80 ( $\Phi = 0,005$  (A),  $\Phi = 0,008$  (B),  $\Phi = 0,015$  (C),  $\Phi = 0,031$  (D),  $\Phi = 0,042$  (E). Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65/ Tween 80),  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,86 \times 10^{-4}$  M,  $[AO] = 3 \times 10^{-3}$  M,  $[NED] = 0,019$  M,  $T = 25^\circ\text{C}$ .

### 3.5. Galato de Octilo (OG)

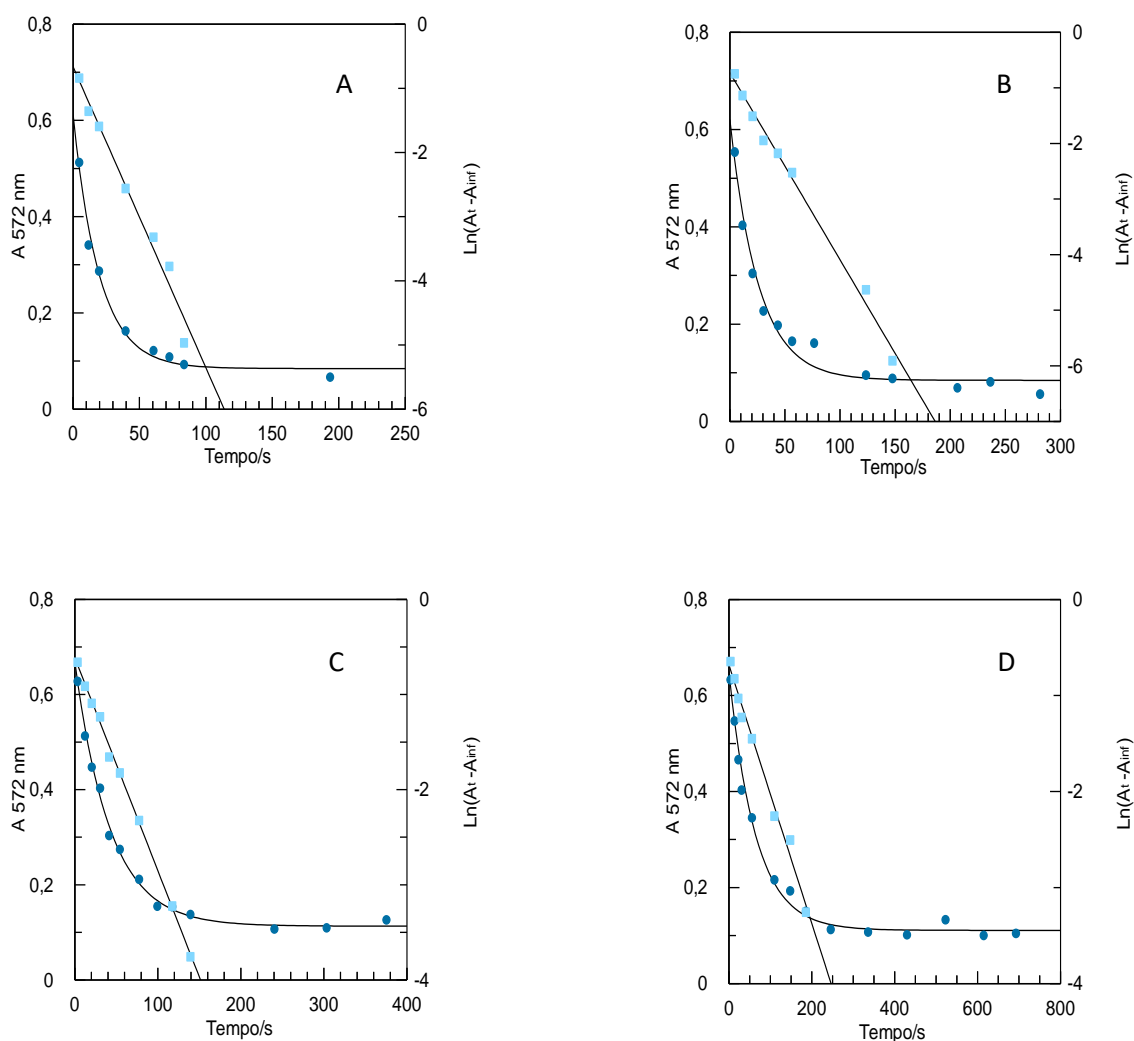






**Figura 63.** Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln [A_t - A_{inf}]$  vs tempo para o OG para as diversas frações de Tween 80 ( $\Phi = 0,005$  (A),  $\Phi = 0,008$  (B),  $\Phi = 0,015$  (C),  $\Phi = 0,022$  (D),  $\Phi = 0,031$  (E) e  $\Phi = 0,042$  (F). Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65/ Tween 80),  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,86 \times 10^{-4}$  M,  $[AO] = 3 \times 10^{-3}$  M,  $[NED] = 0,019$  M,  $T = 25^\circ\text{C}$ .

### 3.6. Galato de Dodecilo (LG)



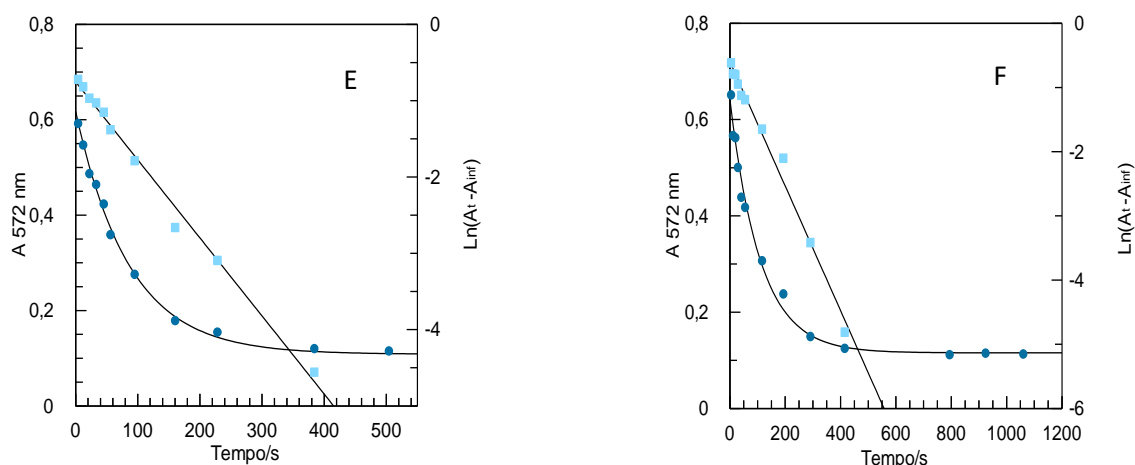


Figura 64. Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de  $\ln [A_t - A_{\infty}]$  vs tempo para o LG para as diversas frações de Tween 80 ( $\Phi = 0,005$  (A),  $\Phi = 0,008$  (B),  $\Phi = 0,015$  (C),  $\Phi = 0,022$  (D),  $\Phi = 0,031$  (E) e  $\Phi = 0,042$  (F). Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65/ Tween 80),  $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,86 \times 10^{-4}$  M,  $[AO] = 3 \times 10^{-3}$  M,  $[NED] = 0,019$  M,  $T = 25^\circ\text{C}$ .

## 4. Teste de estufa de Schaal

Nesta secção encontram-se os resultados das medições da percentagem de dienos conjugados formados para o tempo de permanência das amostras na estufa.

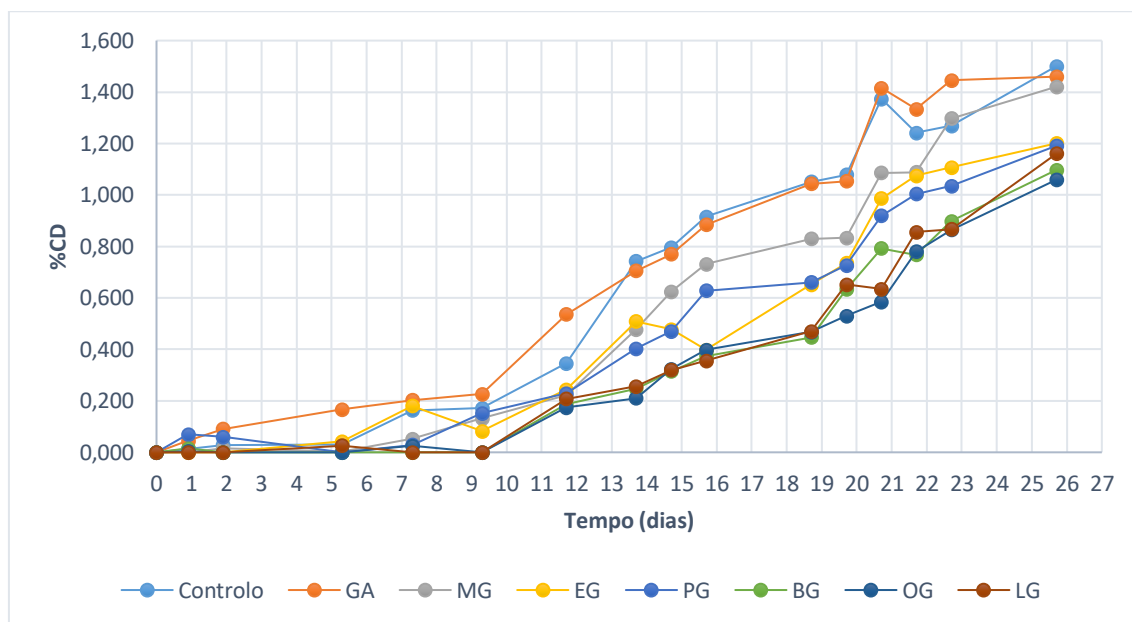


Figura 65. Variação da percentagem de dienos conjugados ao longo do tempo de armazenamento numa estufa termostatzada a  $40^\circ\text{C}$ , com emulsões contendo 1% de Tween 80 e 1,25 mM de antioxidante.

Os dados retirados deste gráfico encontram-se apresentados na Tabela 18 e foram utilizados para a elaboração do gráfico de barras presente na Figura 40 da secção 4.4.5 do capítulo 4.

Tabela 18. Tempo para que as emulsões contendo 1% de emulsionante atingissem o conteúdo em CD de 0,5%.

Composto	Dias $\pm$ DP
Controlo	12,60 $\pm$ 0,36
GA	11,95 $\pm$ 0,35
MG	13,75 $\pm$ 0,35
EG	17,15 $\pm$ 0,07
BG	19,05 $\pm$ 0,07
OG	19,37 $\pm$ 0,45
LG	18,90 $\pm$ 0,10

Nas Figuras 66, 67 e 68 estão representadas as variações da percentagem de dienos conjugados em função do tempo (dias) para amostras contendo 0,5%, 1% e 2% de Tween 80, respetivamente, e uma concentração de 1,25 mM de antioxidante.

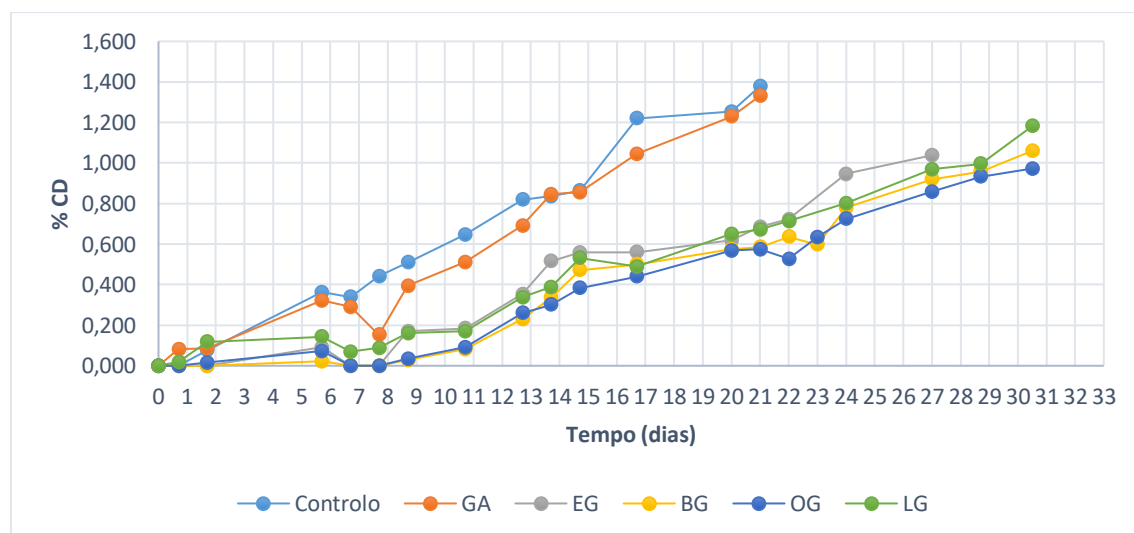


Figura 66. Variação da percentagem de dienos conjugados ao longo do tempo de armazenamento numa estufa termostatzada a 40 °C, com emulsões contendo 0,5% de Tween 80 e 1,25 mM de antioxidante.

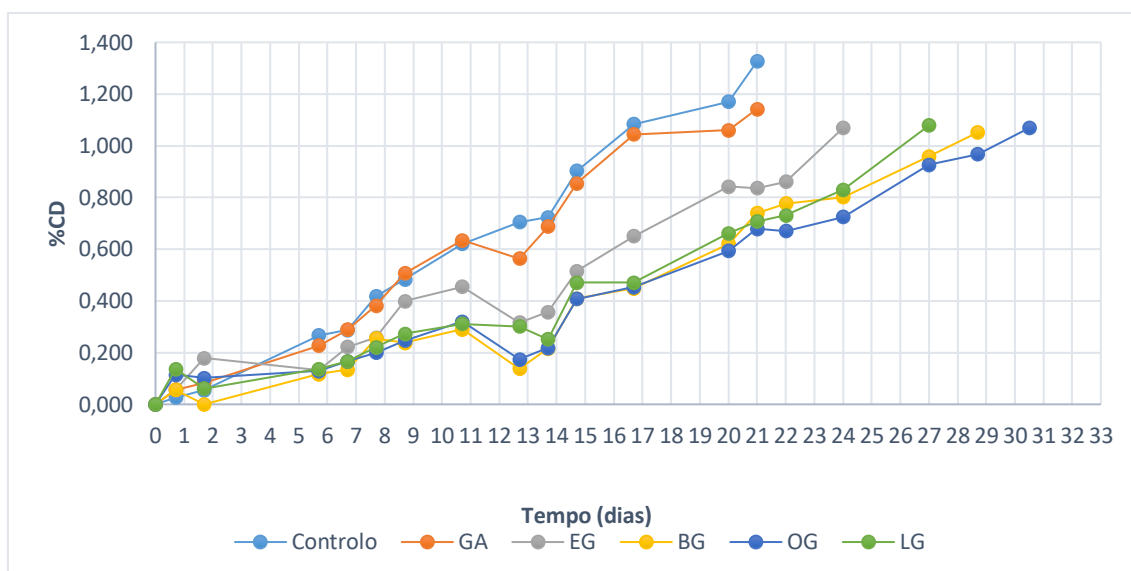


Figura 67. Variação da percentagem de dienos conjugados ao longo do tempo de armazenamento numa estufa termostatzada a 40 °C, com emulsões contendo 1% de Tween 80 e 1,25 mM de antioxidante.

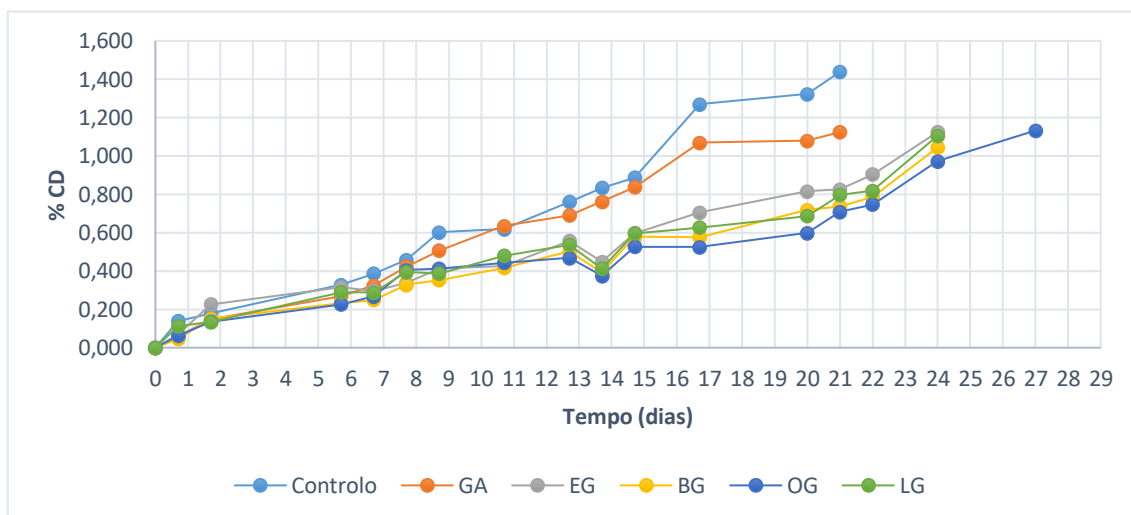


Figura 68. Variação da percentagem de dienos conjugados ao longo do tempo de armazenamento numa estufa termostatzada a 40 °C, com emulsões contendo 2% de Tween 80 e 1,25 mM de antioxidante.

Os dados retirados dos gráficos acima apresentados encontram-se apresentados na Tabela 19 e foram utilizados para a elaboração do gráfico de barras presente na Figura 41 da secção 4.4.5 do capítulo 4.



15 minutos							
	Composto	N	Subconjunto para $\alpha = 0.05$				
			1	2	3	4	5
Tukey HSD <sup>a,b</sup>	LG	2	,0896				
	OG	3	,0930	,0930			
	GA	3		,0946			
	MG	3			,1022		
	PG	3			,1069	,1069	
	BG	3				,1073	
	EG	3					,1128
	Sig.		,258	,914	,061	1,000	1,000
São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.							
a. Usa o Tamanho da Amostra de Média Harmônica = 2,800.							
b. Os tamanhos de grupos são desiguais. A média harmônica dos tamanhos de grupos é usada. Os níveis de erro de Tipo I não são garantidos.							

30 minutos							
	Composto	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
			1	2	3	4	5
Tukey HSD <sup>a,b</sup>	LG	2	,0879				
	OG	3	,0908	,0908			
	GA	3		,0923			
	MG	3			,0994		
	PG	3			,1037	,1037	
	BG	3				,1038	
	EG	3					,1100
	Sig.		,329	,878	,058	1,000	1,000
São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.							
a. Usa o Tamanho da Amostra de Média Harmônica = 2,800.							
b. Os tamanhos de grupos são desiguais. A média harmônica dos tamanhos de grupos é usada. Os níveis de erro de Tipo I não são garantidos.							



### 5.2.2. 0,5%, 1% e 2% Tween 80

Controlo - Dias			
Duncan <sup>a</sup>			
% Tween 80	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2,0	3	8,0000	
,5	3	8,4667	8,4667
1,0	3		8,9333
Sig.		,088	,088
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.			

GA - Dias			
Duncan <sup>a</sup>			
% Tween 80	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2,0	3	8,6333	
1,0	3	8,8000	
,5	3		10,4000
Sig.		,698	1,000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.			

EG - Dias			
Duncan <sup>a</sup>			
% Tween 80	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2,0	3	7,7333	
,5	3		13,6667
1,0	3		14,4333
Sig.		1,000	,082
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.			



BG - Dias		
Duncan <sup>a</sup>		
% Tween 80	N	Subset for alpha = 0.05
		1
2,0	3	14,3000
,5	3	16,9667
1,0	3	16,9667
Sig.		,056
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.		
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.		

OG - Dias			
Duncan <sup>a,b</sup>			
% Tween 80	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2,0	2	14,2000	
1,0	3		17,4000
,5	3		18,1667
Sig.		1,000	,134
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,571.			
b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.			

LG - Dias			
Duncan <sup>a</sup>			
% Tween 80	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2,0	3	14,1667	
1,0	3		17,1000
,5	3		17,2000
Sig.		1,000	,781
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.			